Die Cardenolidglykoside von ADONIS VERNALIS L. sowie Beiträge zur Analytik entsprechender Kombinationspräparate

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

des

Fachbereichs Pharmazie und Lebensmittelchemie

der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von

PETER JUNIOR

aus Essen-Ruhr

Marburg 1978

Druck: Mauersberger, Marburg

Die Cardenolidglykoside von ADONIS VERNALIS L. sowie Beiträge zur Analytik entsprechender Kombinationspräparate

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereichs Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von

PETER JUNIOR
aus Essen-Ruhr

Marburg 1978

Druck: Mauersberger, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Vom Fachbereich Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

als Dissertation angenommen am: 26.4.1978
Tag der mündlichen Prüfung: 26.4.1978
Berichterstatter: Prof. Dr. M. Wichtl
Mitberichterstatter: Prof. Dr. P. H. List

Die vorliegende Arbeit entstand am
Institut für Pharmazeutische Biologie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn
unter Leitung von

Herrn Prof. Dr. M. Wichtl.

Für seine großzügige Unterstützung
und die wertvollen Anregungen möchte
ich Herrn Professor Wichtl herzlich
danken.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546009_0025

Inhaltsverzeichnis

Seite

A. Einleitung

1. Zur Geschichte von ADONIS VERNALIS als Arzneipflanze 1

a) Abbildungen 12

2. Überblick über bisher aus ADONIS VERNALIS isolierte Cardenolide 20

3. Problemstellung der Dissertation 24

B. Chromatographische Methoden zur Auftrennung des Gesamtglykosidkomplexes

1. Extraktion der Cardenolide aus dem Kraut von ADONIS VERNALIS 26

2. Papierchromatographische Auftrennung 29

3. Dünnschichtchromatographische Auftrennung in verschiedenen Fließmittelsystemen 31

4. Säulenchromatographie an Kieselgel (SC 1 und SC 2) 36

5. Säulenchromatographie an Aluminiumoxid zur Isolierung von Cardenoliden (SC 3 - SC 6) 37

a) Isolierung von Adonitoxin aus dem Chloroform-Äthanol (2+1)-Extrakt (SC 3) 38

b) Auftrennung größerer Mengen Chloroform-Äthanol (2+1)-Extrakt zur Isolierung unbekannter Cardenolide (SC 4) 39

c) Isolierung größerer Mengen der Glykoside "blau", "grün I" und "grün II" aus Chloroform-Äthanol (2+1)-Extrakt (SC 5) 42

Seite

d) Auftrennung des Chloroform-Extraktes zur Isolierung der Glykoside "blau" und "grün I"; die Glykoside "grau I" und "grau II" (SC 6) 44

C. Vergleichende chromatographische Untersuchungen der durch SC 4 isolierten Glykoside "grün I" und "grün II" mit Extrakten aus STROPHANTHUS KOMBE und STROPHANTHUS HISPIDUS im Hinblick auf in ihnen enthaltene Strophanthidinglykoside 46

1. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen 46

2. Papierchromatographische Trennungen der schwach bis mittel stark polaren Glykoside 49

3. Isolierung von Glykosid "x" aus STROPHANTHUS HISPIDUS durch präparative Papierchromatographie 50

D. Aufarbeitung, Reinigung und Charakterisierung der isolierten Glykoside 52

1. Identifizierung von Glykosid "grün I" 52

2. Identifizierung von Glykosid "x" aus STROPHANTHUS HISPIDUS 57

3. Vergleichende chromatographische Untersuchungen der Glykoside "grün I" und "x" mit authentischem Strophanthidindigitalosid aus STROPHANTHUS LEDIENII 58

4. Identifizierung der Glykoside D und E aus STROPHANTHUS LEDIENII; Anmerkungen von Herrn Prof. Dr. T. REICHSTEIN und Herrn Dr. J. v. EUW 60

5. Charakterisierung von Glykosid "grün III" 68

6. Identifizierung von Glykosid "grün II" 78

Seite

7. Charakterisierung von Glykosid "blau" 84

8. Identifizierung von Glykosid "grau I" 87

9. Charakterisierung von Glykosid "grau II" 93

E. Untersuchungen zur Analytik herzglykosidhaltiger Drogen bezüglich einer Standardisierung sowie der Qualitätskontrolle von Extrakten und Kombinationspräparaten

1. Säulenchromatographische Untersuchungen an Aluminiumoxid zur Bestimmung der irreversiblen Adsorption von Cardenoliden 99

a) Gesamtextrakt von ADONIS VERNALIS 100

b) Extrakt des Kombinationspräparates MIROTON ® 101

2. Quantitative Dünnschichtchromatographie 102

a) In situ-Fluoreszenzmessung von Adonitoxin aus ADONIS VERNALIS 103

b) In situ-Fluoreszenzmessung von Oleandrin aus NERIUM OLEANDER 106

c) In situ-Remissionsmessung von Scillaren A und Proscillaridin A aus URGINEA MARITIMA 111

d) Indirekte spektralphotometrische Bestimmung von Proscillaridin A aus URGINEA MARITIMA 117

e) In situ-Fluoreszenzmessungen von Adonitoxin und Oleandrin aus dem Kombinationspräparat MIROTON ® 117

F. Experimenteller Teil

Seite

I. Aufarbeitung und Extraktion der Drogen

1. ADONIS-Extrakte 121

2. OLEANDER-, SCILLA- und STROPHANTHUS-Extrakte 123

3. MIROTON® -Extrakt 125

II. Allgemeine Methoden zur Isolierung und Identifizierung von Verbindungen aus den Extrakten 126

1. Dünnschichtchromatographie 126

2. Präparative Schichtchromatographie 127

3. Papierchromatographie 128

4. Präparative Papierchromatographie 129

5. Säulenchromatographie von ADONIS-Extrakten

a) an Kieselgel (SC 1 und SC 2) 130

b) an Aluminiumoxid (SC 3 - SC 6) 131

6. Farbreaktionen 135

7. Spaltung von Glykosiden durch saure Hydrolyse 139

8. Reduktion mit Natriumboranat 140

9. Spektroskopische Methoden und Schmelzpunktbestimmung 141

III. Aufarbeitung einzelner Säulenfraktionen 143

1. Isolierung und Identifizierung von Strophanthidindigitalosid aus ADONIS VERNALIS 143

2. Isolierung und Identifizierung von Strophanthidindigitalosid aus STROPHANTHUS HISPIDUS 144

3. Identifizierung der Glykoside D und E aus STROPHANTHUS LEDIENII als Helveticosid bzw. Helveticosol 145

Seite

4. Isolierung und Charakterisierung von Glykosid "grün III" aus ADONIS VERNALIS 146

5. Isolierung und Identifizierung von Desglucocheirotoxin aus ADONIS VERNALIS 146

6. Isolierung und Charakterisierung von Glykosid "blau" aus ADONIS VERNALIS 148

7. Isolierung und Identifizierung von Cymarol aus ADONIS VERNALIS 149

8. Isolierung und Charakterisierung von Glykosid "grau II" aus ADONIS VERNALIS 150

IV. Quantitative Dünnschichtchromatographie 150

1. Substanzen, Konzentrationen, Lösungen und Auftragesystem 150

2. Chromatographische Parameter 152

3. Densitometerdaten 153

4. Auswertung 154

5. Indirekte spektralphotometrische Bestimmung von Proscillaridin A 154

G. Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlußbetrachtung 156

H. Literaturverzeichnis und Abbildungsnachweis 161

A. Einleitung

1. Zur Geschichte von ADONIS VERNALIS L. als Arzneipflanze

Die Gattung ADONIS erhielt ihren Namen nach einer aus dem Orient stammenden Gottheit, die auch in Griechenland verehrt wurde, jedoch niemals zu den großen, ins Menschenleben einwirkenden Göttern zählte.

Der Sage nach gilt Adonis als Sohn des assyrischen Königs Theias oder des kyprischen Königs Kinyras und dessen Tochter Myrrha. Als Geliebter der Aphrodite stirbt er durch einen Eber, aus seinem Blut und den Tränen der Geliebten entsteht eine rote Blume. Zur Erinnerung an den toten Gott wurden bei alljährlichen Festen Klagelieder gesungen und auf den Hausdächern sogenannte Adonisgärtchen aufgestellt. Als Symbol der rasch verblühenden Jugend enthielten sie die im Mittelmeerraum mit zahlreichen Arten vertretene Anemone sowie eine Adonium genannte, durch blutrote Korollblätter mit schwarzem Schlundfleck auffallende Blume, bei der es sich sehr wahrscheinlich um ADONIS AUTUMNALIS L. gehandelt hat.

Verfolgt man die Geschichte von ADONIS VERNALIS L., so erkennt man eine enge Verknüpfung mit HELLEBORUS NIGER L. und VERATRUM ALBUM L. Auf der Suche nach der Nießwurz des HIPPOCRATES wurden die unterirdischen Organe dieser Pflanzen in den Arzneischatz eingebracht, wobei ADONIS VERNALIS L. lange Zeit als die "rechte schwarze Nießwurz" und als "Helleborus Hippocratis" galt.

Anhand des HORTUS SANITATIS GERMANICE , des HORTUS EYSTETTENSIS und der Kräuterbücher von O. BRUNFELS, H. BOCK, L. FUCHS, A. LONICERUS und J. TH. TABERNAEMONTANUS soll die Bedeutung dieser drei Pflanzen als Arzneipflanzen in einem Zeitraum von etwa 250 Jahren aufgezeigt werden.

a) HORTUS SANITATIS GERMANICE (1485) [1]

Die Kapitel 165 und 166 behandeln die weiße und die schwarze Nießwurz, hier Elleborus albus und Elleborus niger genannt. Den synonym verwendeten Namen folgt eine kurze Beschreibung der Pflanzen unter Berufung auf SERAPIO, der zu entnehmen ist, daß Elleborus albus mit VERATRUM ALBUM L. und Elleborus niger mit HELLEBORUS NIGER L. identisch ist. Die Aufzählung der Anwendungsgebiete und Zubereitungen der beiden Drogen bei den Autoren SERAPIO, GALEN, HIPPOCRATES, AVICENNA, MESUE und PLINIUS schließt sich an.

Prinzipiell unterscheiden sich beide Drogen in ihrer Wirkung dadurch, daß die weiße Nießwurz durch Erbrechen, die schwarze durch den Stuhlgang austreibt und reinigt. Der weißen Nießwurz wird eine doppelt so starke Wirkung zugeschrieben wie der schwarzen, wobei eine ausdrückliche Warnung vor der weißen Nießwurz für einen bestimmten Personenkreis wie Kinder, alte kranke Leute und Magere ausgesprochen wird.

Eine Abbildung von Elleborus albus ist nicht vorhanden, wohl aber von Elleborus niger. Diese zeigt aber keineswegs HELLEBORUS NIGER L. wie es nach der Beschreibung zu erwarten wäre, sondern ADONIS VERNALIS L. Zwar ist die Abbildung

nicht naturgetreu, sondern noch vom gotischen Stil geprägt, doch ist die Pflanze in ihrem Habitus trotz Fehlens einer Blüte deutlich zu erkennen (Abb. 1).

b) Otho BRUNFELS, Kreuterbuch (1532) [2]

Unter dem Namen Christwurz oder Nießwurz ist eine Pflanze abgebildet, die auch aufgrund der Beschreibung sehr gut als HELLEBORUS VIRIDIS L. zu identifizieren ist. Der Aufzählung des griechischen Namen Helleborus und des lateinischen Veratrum schließt sich die Geschichte der Pflanze an. Auch BRUNFELS unterscheidet zwischen weißer und schwarzer Nießwurz, doch scheint er die weiße, VERATRUM ALBUM L., selbst nicht gekannt zu haben, da er sie zunächst mit den Worten "... hat bletter wie spitzer wegerich/ aber nit so lang/ noch so breit ..." beschreibt, dann aber festgestellt, daß die schwarze und die weiße gleich, nur die Blätter der schwarzen schmaler und zarter seien.

Es folgt die Beschreibung, wo man die Wurzel findet, wie und zu welcher Zeit man sie graben soll sowie eine umfangreiche Warnung vor der Giftigkeit der Wurzel unter Hinweis auf die Schrift des HIPPOCRATES über den Gebrauch der Nießwurz.

Die Vorschrift zur Zubereitung und Anwendung erfolgt unter der Voraussetzung, daß die Behandlung nur durch Ärzte vorgenommen wird, die um die Gefährlichkeit der Droge wissen.

Die Tatsache, daß eine Abbildung der weißen Nießwurz fehlt, kann als Hinweis dafür betrachtet werden, daß BRUNFELS die Pflanze nicht gekannt und ihre Beschreibung teilweise übernommen hat.

c) Leonhart FUCHS, Neu Kreuterbuch (1543) [3]

Kapitel 105 behandelt die weiße Nießwurz, hier als Elleborus candidus oder albus bzw. Elleborus leucos bezeichnet. Die Pflanzenbeschreibung ist minutiös und läßt ebenso wie die Abbildung VERATRUM ALBUM L. erkennen. Nach Angabe des Standortes und der Blütezeit bzw. der Samenreife erfolgt auch hier ein Hinweis auf die Gefährlichkeit der Droge unter Berufung auf GALEN sowie die Vorschrift zur Anwendung.

Kapitel 106 ist der Christwurz gewidmet. Hier findet sich erstmals ein Hinweis auf eine weitere Pflanze neben Helleborus und Veratrum, wenn es über Christwurz heißt: " Würt von yederman schier für die schwartz Nießwurtz gehallten/ die sie doch nit ist ...". Dieser Behauptung liegt ein Vergleich mit der Beschreibung des DIOSCURIDES zugrunde. FUCHS befürwortet den Gebrauch der Christwurz jedoch, da sie seiner Meinung nach kaum eine unterschiedliche Wirkung im Vergleich zur schwarzen Nießwurz besitze, abgesehen davon, daß sie weniger gefährlich sei als diese.

Er unterscheidet zwei Arten von Christwurz, die sich so ähnlich seien, daß man sie kaum voneinander trennen könne. Die recht genaue Beschreibung und die Abbildungen beider Pflanzen lassen HELLEBORUS VIRIDIS L. und HELLEBORUS FOETIDUS L. erkennen, von FUCHS als "zam Christwurtz" bzw. "Leüßkraut" genannt.

Die Anwendung erfolgt in gleicher Weise wie bei der schwarzen Nießwurz, doch ist die Christwurz weniger kräftig und unschädlicher. Interessant ist hier die Herstellung von Zäpfchen aus der Wurzel zur Behandlung der Amenorrhoe.

d) Hieronymus BOCK, Neu Kreuterbuch (1577) [4]

Im Kapitel 135 beschreibt BOCK die Christwurzel. Auch er unterscheidet wie FUCHS zwischen zwei Pflanzen, die ebenfalls als HELLEBORUS VIRIDIS L. und HELLEBORUS FOETIDUS L. zu identifizieren sind. Bemerkenswert erscheint die Abbildung der Christwurzel. Es handelt sich hier um eine spiegelbildliche Wiedergabe der Abbildung, die BRUNFELS in seinem Kräuterbuch verwendet. Geringe Abweichungen sind an den Wurzeln und Blättern festzustellen.

Erstmals wird hier eine Beschreibung der Pflanze gegeben, die für die rechte schwarze Nießwurz gehalten wurde.

" Aber die recht Schwartz Nießwurtzel/ welche unsere Wurtzelkrämer auch Christwurtz heissen/ ist wol ein schoen gewaechs mit stengel/ wurtzel unnd blumen/ etwan uber zwo spannen hoch/ die wurtzel ist zasecht/ verwürrt/ durch einander geschrenckt/ gantz schwartz/ aller ding wie die Christwurtz/ aber die stengelein seind von unden an biß oben aussen/ mit zarten reinen zerkerfften blaettlein besetzet/ aller ding wie das klein Stabwurtz/ doch gruener/ unnd ganz drauschelecht/ im gypffel erscheinen im Fruehling gaelfarbe eintzige blumen/ vast wie der Chamillen/ doch vil groesser/ so die abfellt/ erscheint ein Kolbecht gypffelein/ wie das obertheil am Kyfferholtz/ das selbig ist der samen."

Im nächsten Abschnitt folgt die Erklärung des Namens "Christwurtzel" und eine Aufzählung der synonym verwendeten Namen in

Anlehnung an DIOSCURIDES, PLINIUS, THEOPHRAST, HIPPOCRATES, SERAPIO und MESUE. Im weiteren Verlauf setzt sich BOCK mit der Meinung auseinander, daß Christwurz der schwarzen Nießwurz entspreche. Er verneint dieses, da seine Christwurz unschädlich sei, was er von der schwarzen Nießwurz nie gelesen habe.

Die unter dem Namen "schwartz Nießwurtz" abgebildete Pflanze ist sehr gut als ADONIS VERNALIS L. zu identifizieren (Abb. 2), die bereits zitierte Beschreibung belegt dieses einwandfrei.

Zubereitung und Anwendung der schwarzen Nießwurz erfolgt nach den gleichen Gesichtspunkten wie bei den anderen Autoren.

In Kapitel 136 finden sich Abbildung und Beschreibung der weißen Nießwurz sowie die Aufzählung der von DIOSCURIDES synonym verwendeten Namen. Die Christwurzel wird noch einmal als eine unschädliche Arznei bezeichnet, im Gegensatz zur weißen und schwarzen Nießwurz, bei denen es sich um giftige Arzneien handele.

e) Adamus LONICERUS, Kreuterbuch (1679) [5]

Im Kapitel 215 werden schwarze Nießwurz und Christwurz aufgeführt. Die Beschreibung der schwarzen Nießwurz, Veratrum nigrum genannt, lautet folgendermaßen:

" Es hat die schwartze Nießwurtz durchaus kleine zerkerffte Blaettlin/ wie die Stabwurtz/ gruen/ dreuschlecht/ traegt oben geelfarbe einzige Blumen/ wie Camillen/ darnach gibts ein Gipffelin/ wie oben am kleinen Schafftheu. Und dieses ist

die rechte schwartze Nießwurtz/ wie sie auch nunmehr bekant ist/ und gebraucht wird."

Auch hier handelt es sich um ADONIS VERNALIS L., wie auch die Abbildung der Pflanze bestätigt (Abb. 3).

Die als Christwurz abgebildete Pflanze wird als "falsche schwartze Nießwurtz" bezeichnet, davon unterschieden eine wilde Christwurzel, näher unter den "Laeußkräutern" beschrieben. Die beiden Pflanzen lassen sich wieder als HELLEBORUS VIRIDIS L. und HELLEBORUS FOETIDUS L. identifizieren.

Auch Zubereitung und Anwendung der schwarzen Nießwurz unterscheiden sich nicht von denen der anderen Autoren.

Das Kapitel 216 gilt der weißen Nießwurz, genannt "Elleborus und Veratrum album". Beschreibung und Abbildung zeigen wiederum VERATRUM ALBUM L.

f) Basilius BESLER, Hortus Eystettensis (1713) [6]

Unter der Bezeichnung "Pseudo Helleborus niger" ist eine Pflanze abgebildet, bei der es sich eindeutig um ADONIS VERNALIS L. handelt (Abb. 4).

g) D. Jakobus Theodorus TABERNAEMONTANUS, Kraeuterbuch (1731) [7]

Im Kapitel 16, welches "von dem Adonio" überschrieben ist, beschreibt TABERNAEMONTANUS Pflanzen, die er "Brunet=Roeßlein oder Adonis=Roeßlein" nennt. Hier heißt es:

"... bringet von einer zasechtigen Wurtzeln vier oder fuenff Stengel/ die fast einer Elen lang seyn/ mit vielen Nebenaestlein alle geschraufft/ oder mit Holkaelen unterscheiden/ an der Farb gruenlechtig. Es hat kleine zarte Blaettlein/ der Chamillen oder Krottendill gleich/ doch etwas groesser/ feister und sattgruener. An den Gipffeln der Stengel und Nebenaestlein kommen gegen dem Maeyen und im Brachmonat herfuer die schoene liebliche Menigfarbe Roeßlein oder Blumen/ die sich der Blumen des Hahnenfuß in der Groesse vergleichen."

Unterschieden werden hiervon zwei Arten, deren Blütenfarbe gelb bzw. weiß ist, die seltener als das beschriebene Adonium mit mennigroten Blüten sind, in allen anderen Merkmalen diesem jedoch gleichen. Aufgrund der Beschreibung und der Abbildungen des "Adonium" und des "Adonium luteum" kann es sich hierbei um ADONIS AESTIVALIS L., genauer Variatio AESTIVALIS bzw. PALLIDA gehandelt haben (Abb. 5 und 6).

Ein Abschnitt ist der Herkunft des Namen gewidmet, wobei das Brunet-Röslein von den Anemonen abgegrenzt wird. Unter Berufung auf OVID bringt TABERNAEMONTANUS seine Zweifel an der Identität der beiden Pflanzen zum Ausdruck, da die Anemone sich nur öffne, wenn ein Wind wehe, das Adonium sich aber von selbst öffne und auch offenbleibe wie andere Blumen.

Als Anwendungsgebiet wird nur das Austreiben der kalten Feuchtigkeit erwähnt, ansonsten galt die Pflanze in Gärten als Zierpflanze.

Im Kapitel 84 ist unter dem Titel "Von rohten Feldroeslein" eine Pflanze beschrieben, die als Blüten "rohte oder gelbe Roeslein" trägt. Sie wird hier den "Anemonenroeslein" zugerechnet, obwohl es sich aufgrund der Beschreibung und der Abbildung, die interessanterweise der des "Adonium" bis auf die spiegelbildlich angebrachte Wurzel zum Verwechseln ähnlich sieht, mit Sicherheit auch um ADONIS AESTIVALIS L. handeln muß (Abb. 7).

Erwähnenswert ist an dieser Stelle die Tatsache, daß TABERNAEMONTANUS sich gegen eine Verwechslung von Brunetröslein und Feldröslein ausspricht:

> "Es vermischen etliche die Brunet=Roeßlein mit den Feldroeßlein/ welches nicht einen geringen Irrthum bringet/ sintemal diese Gewaechs einander fast gleich seyn/ ist aber doch ein grosser Unterschied darunter/ der wol zu mercken ist/..."

Eine genaue Bestimmung von Adonisarten war zu dieser Zeit ohne carpologische Kriterien nicht möglich.

Kapitel 7 des 2. Bandes gibt unter dem Titel "Von Nießwurtz" eine Beschreibung der weißen Nießwurz unter dem Namen Helleborus albus. Anwendung und Zubereitung wird wiederum in gleicher Weise vorgenommen wie bei den bereits genannten Autoren. In Abbildungen und Text wird hier zwischen "Weiß Nießwurtz Maennlein" und "Weiß Nießwurtz Weiblein" unterschieden.

Kapitel 8 des 2. Bandes enthält unter dem Titel "Von Nießwurtz" die Wiedergabe einer Beschreibung des MATTHIOLUS.

"Diese Nießwurtz wird bey Matthiolo beschrieben/ daß sie zweyer Spannen hoch wachse: Ihr Wurtzel sey schwartz wie die schwartze Nießwurtz/ doch nicht so gar/ die Wuertzelein seyen auch etwas zart: [verwirret/ und durch einander geschrencket:] Der Stengel seye weich und zart/ an welchem goldgelbe glintzende Blumen wachsen/ wie Knedill/ doch ein wenig groesser/ darauß langlechte Knoepf entspringen/ fast wie die Brombeer/ [welcher der Saame ist:] Ihre Blaetter seyn zart und subtil/ wie an dem Fenchel oder an der Ferula.
Sie waechst im Boehmerland/ auch in Teutschland/ um Jena in Thueringen/ und um Wien herum: bluehen im Aprill und im Maey."

Unter dem Namen "Helleborus Hippocratis" ist eine Pflanze abgebildet, die ebenso eindeutig wie bei BOCK als ADONIS VERNALIS L. zu identifizieren ist (Abb. 8), im Text "vermeinte schwartze Nießwurtz" genannt.

Kapitel 9 des 2. Bandes beschreibt zwei HELLEBORUS-Arten als "Laeußkraut", wovon das eine wiederum als HELLEBORUS FOETIDUS L. zu erkennen ist. Beide Pflanzen werden von TABERNAEMONTANUS zu der Nießwurz gerechnet.

Im 10. Kapitel des 2. Bandes sind unter dem Titel "Von schwartz Nießwurtz" zwei HELLEBORUS-Arten aufgeführt, die "schwartz Nießwurtz" und "steirisch Christwurtz" bzw.

"Veratrum nigrum" und "Veratrum nigrum Stiriacum" benannt werden. Bei der "steirisch Christwurtz" könnte es sich eventuell um HELLEBORUS NIGER L. gehandelt haben.

Zubereitung und Anwendung der Drogen erfolgt unter gleichen Gesichtspunkten wie bei den übrigen Autoren.

Der Überblick über die genannten Werke zeigt das Bemühen aller Autoren, die Nießwurz des HIPPOCRATES aufzufinden und diese den Menschen ihres Zeitalters zu ihrem Nutzen zugänglich zu machen. Die Suche nach dieser sagenhaften Pflanze hat ergeben, daß zwei Pflanzengattungen bereits im Mittelalter durch gleiche Verwendung zueinander in Beziehung gesetzt werden konnten, die heute beide der Familie der RANUNCULACEAE angehören. Darüberhinaus sind diese beiden Gattungen die einzigen aus der Familie der RANUNCULACEAE, welche herzwirksame Glykoside beinhalten. Diese Zusammenhänge wurden in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts entdeckt, aber es dauerte weitere fünfzig Jahre, bis REICHSTEIN und ROSENMUND (1940) [8] das Cymarin aus ADONIS VERNALIS L. bzw. KARRER (1943) [9] das Hellebrin aus HELLEBORUS-Arten als erste kristalline Glykoside isolieren konnten.

Abb. 1

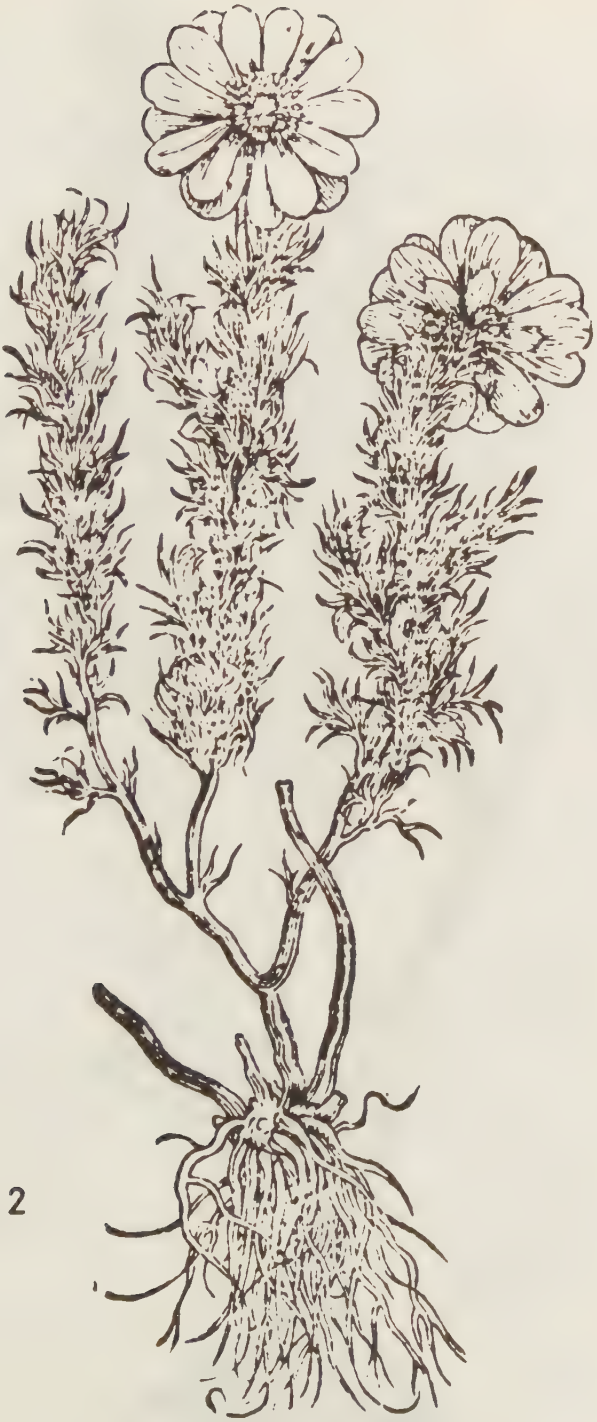


Abb. 2

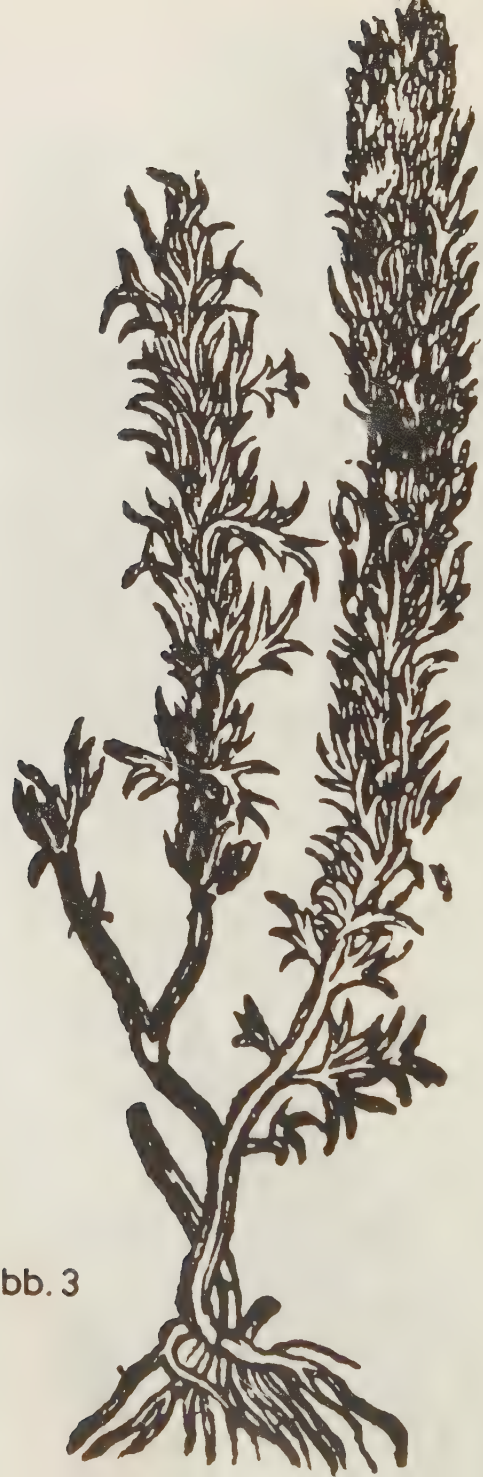


Abb. 3

Abb. 4

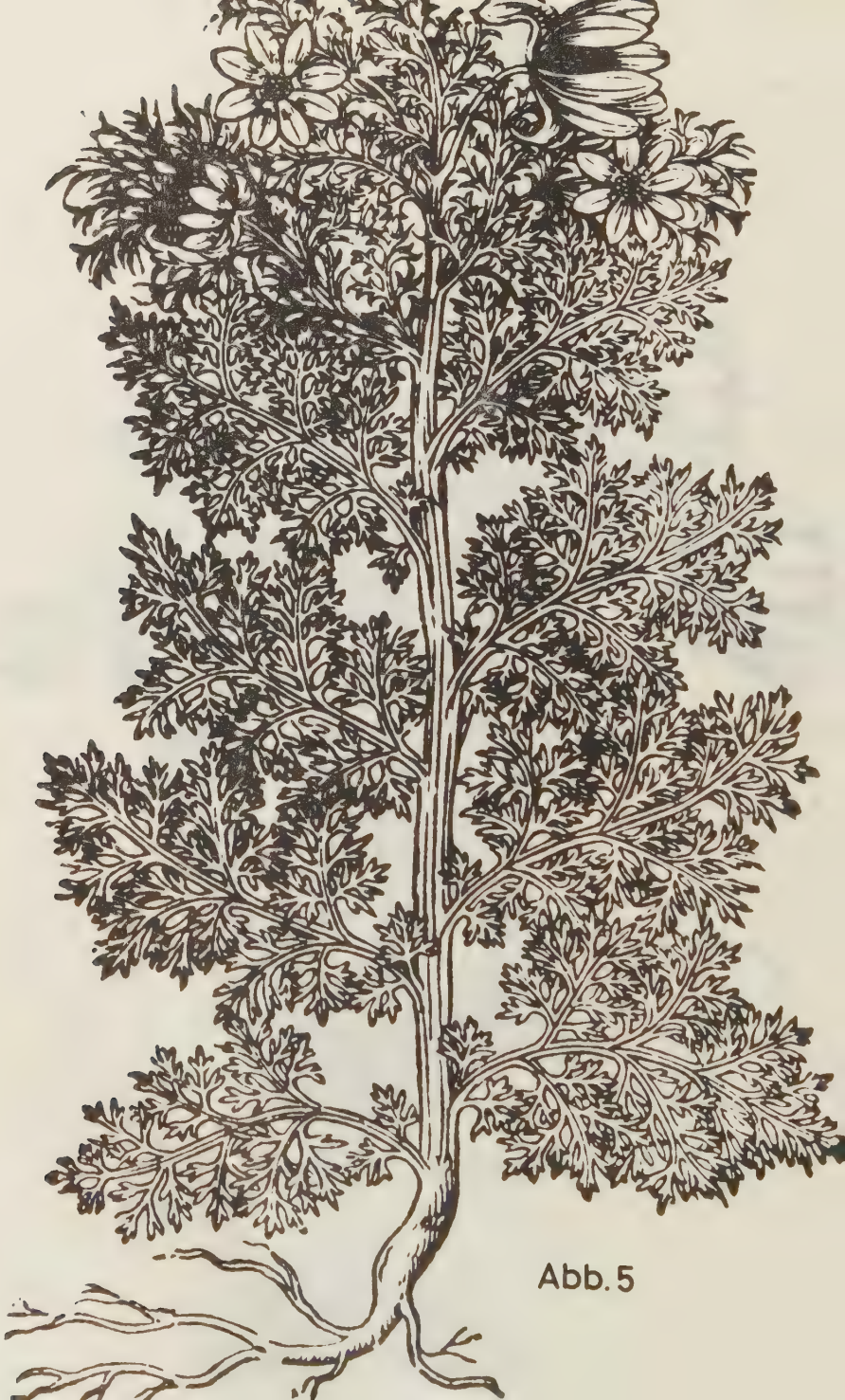


Abb. 5

Abb. 6

Abb. 7

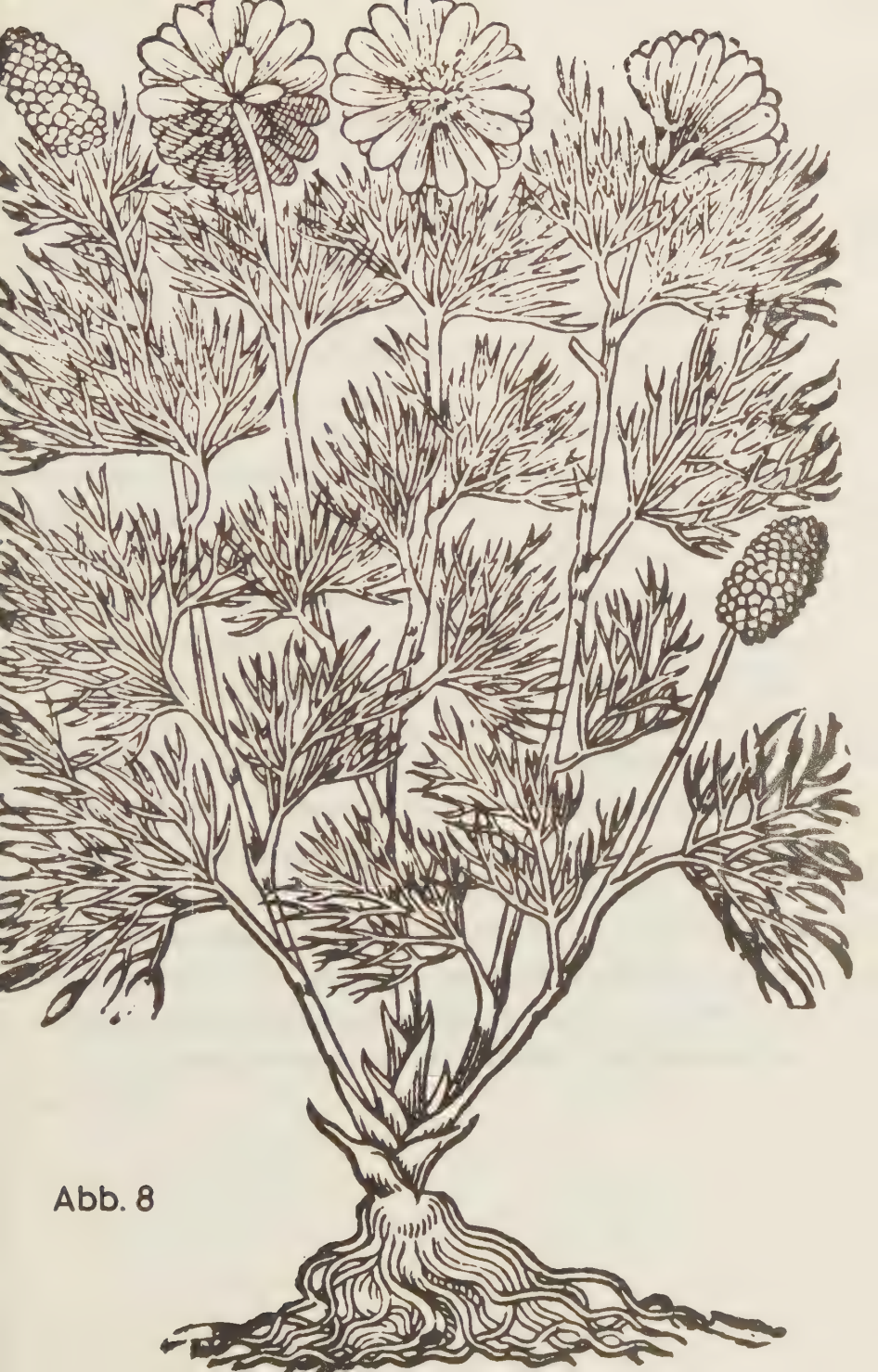


Abb. 8

2. Überblick über bisher aus ADONIS VERNALIS isolierte Cardenolide

Seit der bereits erwähnten Isolierung des Cymarins als erstem kristallinen Glykosid aus ADONIS VERNALIS durch REICHSTEIN und ROSENMUND (1940) [8] sind aus dieser Ranunculacee zahlreiche weitere Cardenolide isoliert und identifiziert worden.

So konnten KATZ und REICHSTEIN (1947) [10] das Adonitoxin auffinden, ein L-Rhamnose enthaltendes Glykosid des Adonitoxigenins, dessen endgültigen Strukturbeweis TSCHESCHE und PETERSEN (1953) [11] erbrachten. Im Laufe der sechziger Jahre wurde von einer Fülle neuer Cardenolide berichtet. CEKAN und PITRA [12] sowie KOLESNIKOW und BUGRIM (1960) [13] isolierten im gleichen Jahre Acetyladonitoxin und 16-OH-Strophanthidin beziehungsweise Strophanthidin, Cymarin und k-Strophanthin-ß.

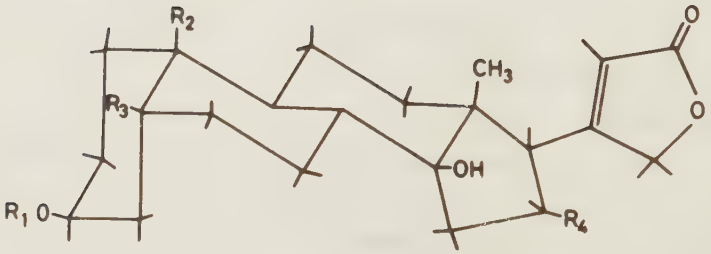
Vernadigin, 3-Acetylstrophadogenin und Adonitoxigenin-2-O-acetylrhamnosid durch POLAKOVA und CEKAN [14], Adonitoxol durch CSEREP und Mitarbeiter [15] und k-Strophanthosid durch GÖRLICH [16] lauteten die Forschungsergebnisse für den Zeitraum von 1963 bis 1965. Über ein bis heute ungeklärtes Cardenolid berichten BUCHNER und Mitarbeiter [17], als bisher letztes Glykosid wurde Strophanthidinfucosid durch WICHTL, JENTZSCH und TÜRK (1971) [18] isoliert und aufgeklärt.

Die folgende Zusammenstellung soll eine Übersicht der genannten Cardenolide geben, aufgeschlüsselt nach ihren Aglyka.

Aglykon	Cardenolid	Substituent an C_3
Strophanthidin	Cymarin	Cymarose
	k-Strophanthin-ß	Cymarose-Glucose
	k-Strophanthosid	Cymarose-Glucose-Glucose
	Strophanthidin-fucosid	Fucose
Adonitoxigenin	Adonitoxin	Rhamnose
	Adonitoxigenin-3-O-acetylrhamnosid	3-O-Acetylrhamnose
	Adonitoxigenin-2-O-acetylrhamnosid	2-O-Acetylrhamnose
Adonitoxigenol	Adonitoxol	Rhamnose
16-OH-Strophanthidin	Vernadigin	Diginose
	3-Acetyl-Strophadogenin	CH_3CO-

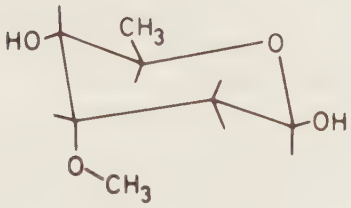
Diese Übersicht macht deutlich, daß die bisher bekannten Cardenolide sich von vier verschiedenen Aglyka ableiten. Die meisten der erwähnten Glykoside gehören zur Strophanthidinreihe.

Die nachfolgende Tabelle zeigt die Raumformel der Aglyka Strophanthidin, Adonitoxigenin, Adonitoxigenol und 16-OH-Strophanthidin.

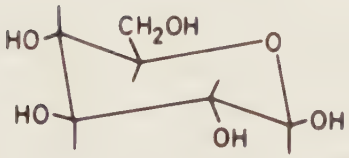


	R_1	R_2	R_3	R_4
Strophanthidin	H	CHO	OH	H
16-OH-Strophanthidin	H	CHO	OH	OH
Adonitoxigenin	H	CHO	H	OH
Adonitoxigenol	H	CH_2OH	H	OH

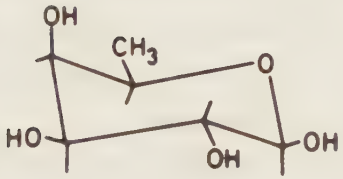
Die Zuckerkomponenten der Glykoside aus ADONIS VERNALIS:



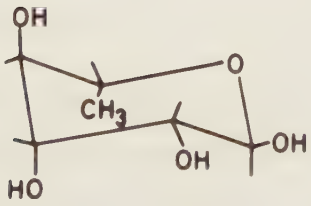
Cymarose



Glucose

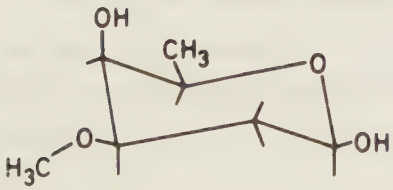


Fucose



Rhamnose

(2-O-Acetyl-)
(3-O-Acetyl-)



Diginose

3. Problemstellung der Dissertation

Wie das Formelschema erkennen läßt, ist das Adonitoxigenin dem Strophanthidin isomer. Es unterscheidet sich von diesem durch die Stellung der Hydroxyl-Gruppe an C-Atom 16 statt an C-Atom 5. 16-OH-Strophanthidin trägt an beiden C-Atomen Hydroxylgruppen, während Adonitoxigenol statt der Aldehydfunktion an C-Atom 19 eine alkoholische Gruppe besitzt, also dem Strophanthidol isomer ist. Zumindest formal ist also ein Zusammenhang zwischen den genannten Aglyka festzustellen.

Untersuchungen an CONVALLARIA MAJALIS L. und an verschiedenen STROPHANTHUS-Arten haben erbracht, daß neben den hier vorkommenden Strophanthidinglykosiden häufig auch die entsprechenden Strophanthidolderivate vorhanden sind. Ausgehend von dieser Tatsache erschien es von Interesse, den Glykosidkomplex von ADONIS VERNALIS auf das Vorkommen von Strophanthidol und Strophanthidolglykosiden zu untersuchen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Überprüfung des Glykosidkomplexes von ADONIS VERNALIS auf zusätzliche Verknüpfungspunkte im Glykosidmuster mit anderen cardenolidhaltigen Pflanzen.

Schließlich sollten Beiträge zur Analytik cardenolidhaltiger Drogen im Hinblick auf eine Standardisierung beziehungsweise eine Qualitätskontrolle von Extrakten und daraus hergestellter Kombinationspräparate erarbeitet werden. Die Notwendigkeit einer solchen Qualitätskontrolle gerade von ADONIS-Extrakten wegen der leichten Zersetzbarkeit der Cardenolide wird bereits von BOGS und HARNISCH (1966) [19] betont. Die

Autoren nahmen hierzu eine Bestimmung des Adonitoxins, des 16-OH-Strophanthidins und des Cymarins vor. Die Kontrolle von ADONIS-Extrakten und eines Kombinationspräparates durch dünnschichtchromatographische Verfahren wird von GÖRLICH (1965) [16] beschrieben. Ziel unserer Untersuchungen sollte die quantitative Bestimmung eines oder mehrerer Hauptinhaltsstoffe aus Herba ADONIDIS, Folia OLEANDRI und Bulbus SCILLAE auf dünnschichtchromatographischem Wege durch densitometrische Direktauswertung sein, da diese Drogen besonders häufig kombiniert werden. Die erarbeiteten Methoden sollten darauf auf ihre Eignung zur Standardisierung eines Kombinationspräparates wie etwa SZILLOSAN ®, KARDESTAL ®, OXACANT ®-forte oder MIROTON ® überprüft werden.

B. Chromatographische Methoden zur Auftrennung des Gesamtglykosidkomplexes

1. Extraktion der Cardenolide aus dem Kraut von ADONIS VERNALIS

Als Ausgangsmaterial aller Untersuchungen kam ein ADONIS-Konzentrat +) (1 ml entsprechend 3,3 g Herba ADONIDIS) mit einem Äthanolgehalt von ca. 35 % zum Einsatz. Die Verwendung dieses Konzentrates erlaubte nicht nur die Herstellung von angereicherten Cardenolid-Extrakten bei möglichst geringem Arbeits- und Zeitaufwand, es konnte darüber hinaus zur Isolierung neuer Verbindungen aus diesen Extrakten jeweils frisches Material eingesetzt werden.

Zur Beurteilung der einzelnen Chargen, deren jeweiliger biologischer Wirkungswert in Meeschweincheneinheiten/ml angegeben war, wurde der Gesamtglykosidgehalt, berechnet als Adonitoxin, mit Hilfe der BALJET-Reaktion [20] ermittelt.

Hierzu war zunächst eine weitgehende Reinigung des Konzentrates von Farb- und Ballaststoffen erforderlich, die, wie bei der Aufarbeitung von Herzglykosiddrogen allgemein üblich, durch eine Fällung der Begleitsubstanzen mit einer Blei-(II)-acetatlösung erfolgte. Der Überschuß an Bleiionen wurde darauf durch Zugabe von Dinatriumhydrogenphosphatlösung aus dem Filtrat entfernt. Dadurch wird bei der Extraktion der Cardenolide

---

+) Der Firma CHEMISCHE WERKE MINDEN danke ich auch an dieser Stelle für die Überlassung des ADONIS-Auszuges.

eine Emulsionsbildung und damit ein möglicher Glykosidverlust vermieden. Das dem Konzentrat zur Stabilisierung zugesetzte NIPAGIN ® wurde durch Ausschütteln mit Petroläther aus der wäßrigen Phase entfernt.

a) Chloroform-Isopropanol (3+2)-Extrakt

Die Ermittlung des Gesamtglykosidgehaltes setzt eine vollständige Extraktion der Cardenolide bei weitgehender Abtrennung noch vorhandener Ballaststoffe voraus. Dabei gilt es, bei der Auswahl eines Lösungsmittels einerseits die Polaritätsspanne zwischen Aglyka und Primärglykosiden zu berücksichtigen, andererseits eine möglichst geringe Löslichkeit der Ballaststoffe in diesem Lösungsmittel anzustreben. Diesen Anforderungen genügt nach TÜRK [21] (Dissertation 1971) am ehesten eine Mischung von Chloroform und Isopropanol im Verhältnis 3:2.

Zur Bestimmung des Gesamtglykosidgehaltes wurde daher die von Ballaststoffen weitgehend befreite wäßrige Lösung mit Chloroform-Isopropanol (3+2) bis zur negativen KEDDE-Reaktion [22] extrahiert. Die Gesamtglykosidgehaltsbestimmung erfolgte aus einer methanolischen Lösung des Rückstandes der vereinigten organischen Phasen in einer entsprechenden Verdünnung. Gemessen wurde die Extinktion einer Mischung gleicher Teile Glykosidlösung und BALJET-Reagenz [20] bei einer Schichtdicke von 1 cm und einer Wellenlänge von 494 nm nach 22 Minuten (s. exp. Teil I.1. Seite 122).

Arbeiten von PUSZ und BÜCHNER [23] (1962/63) ist zu entnehmen, daß in den Blättern von ADONIS VERNALIS 24, in den Blüten sogar 29 Cardenolide nachgewiesen werden konnten. Zur Isolierung unbekannter Verbindungen ist es deshalb vorteilhaft und zweckmäßig, eine grobe Vortrennung des Gesamtglykosidkomplexes vorzunehmen. Aufgrund der unterschiedlichen Polarität der Cardenolide gelingt eine grobe Fraktionierung durch Extraktion von Drogenauszügen mit Lösungsmitteln steigender Polarität, wobei sich die Glykosidspektren der erhaltenen Extrakte mehr oder weniger deutlich überschneiden.

b) Chloroform-Extrakt

Nach der Entfernung der Ballaststoffe aus dem Konzentrat wurde die wäßrige Phase zunächst mit Chloroform ausgeschüttelt. Die vereinigten Chloroformauszüge trockneten wir mit Na_2SO_4 sicc. und engten darauf unter vermindertem Druck zur Trockne ein. Der resultierende Rückstand war sirupös und stark gelbgrün gefärbt.

c) Chloroform-Äthanol (2+1)-Extrakt

Die Extraktion der polareren Glykoside erfolgte mit Chloroform-Äthanol (2+1). Die organischen Phasen wiesen eine gelbe Färbung auf und lieferten nach dem Trocknen mit Na_2SO_4 sicc. beim Entfernen des Lösungsmittels einen festen, ockerfarbenen Rückstand.

d) Chloroform-Äthanol (3+2)-Extrakt

Zur Extraktion der stark polaren Primärglykoside wurde die wäßrige Phase mit Na_2SO_4 x 10 H_2O zur Halbsättigung versetzt und anschließend mit Chloroform-Äthanol (3+2) ausgeschüttelt. Die mit Na_2SO_4 sicc. getrockneten organischen Phasen ergaben einen rotbraun gefärbten, sirupösen Rückstand.

2. Papierchromatographische Auftrennung

Die papierchromatographische Überprüfung der Extrakte erfolgte auf dem Papier SCHLEICHER und SCHÜLL 2043 b Mgl. Die Chromatogramme hatten ein Format von 18 x 60 cm und waren in jeweils 5 Bahnen unterteilt, wobei die Startlinie 11 cm vom unteren Rand entfernt lag. Die Papiere waren zu Beginn der Chromatographie (diese erfolgte absteigend) zu 60 % ihres Trockengewichtes mit der Unterphase des verwendeten Fließmittels imprägniert. Die Extraktrückstände wurden in Chloroform-Methanol (1+1) gelöst (10proz. Lösungen [g/ml]). Auf jeweils eine Bahn wurden je 20 µl der so erhaltenen Extraktlösungen strichförmig aufgetragen. Die noch freie fünfte Bahn diente zur Aufnahme einer Lösung der Vergleichssubstanzen Cymarin und k-Strophanthin-ß.

Zur Chromatographie benutzten wir die Oberphasen der Systeme I Pentanol-Benzol-Wasser (1+1+2) und II Butanol-Xylol-Wasser (1+1+2); die Chromatographierdauer betrug 12 bzw. 8 Stunden. Die entwickelten Chromatogramme wurden 2 Stunden bei 120 °C im Trockenschrank getrocknet, darauf mit einer

25proz. Lösung von Antimontrichlorid in Chloroform besprüht und anschließend vier Minuten auf 105 °C erhitzt. Die Rückseiten der Chromatogramme besprühten wir zur selektiven Erfassung der Cardenolide zusätzlich mit KEDDE-Reagenz [22], das mit Cardenoliden eine blaue bis blauviolette Färbung ergibt (s. exp. Teil II.6.a und b Seite 135, 137).

System I zeigte eine befriedigende Trennung lediglich im Bereich der mittel bis stark polaren Glykoside, während die Aglyka und schwach polaren Glykoside, wie etwa Cymarin, von Ballaststoffen überdeckt, in unmittelbarer Nähe der Fließmittelfront aufzufinden waren. Der Chloroform-Äthanol (2+1)-Extrakt erwies sich qualitativ als nahezu identisch mit dem Chloroform-Äthanol (3+2)-Extrakt, jedoch unterschieden sich beide in der quantitativen Zusammensetzung.

System II ließ ebenfalls eine gute Auftrennung im Bereich der stärker polaren Glykoside erkennen (insgesamt 10 Glykosidzonen), doch wanderte auch hier das Cymarin, im Ballast nur durch positive KEDDE-Reaktion [22] der Glykosidzone auszumachen, praktisch in der Front. Der Chloroform-Extrakt enthielt also neben den wenig polaren Glykosiden und Aglyka die Hauptmenge an Ballaststoffen. Der Chloroform-Isopropanol (3+2 Extrakt wies die gesamte Breite des Glykosidspektrums auf und konnte daher mit Recht als Gesamtextrakt bezeichnet werde

Auf weitere papierchromatographische Untersuchungen von ADONIS-Extrakten wurde verzichtet, da zur qualitativen Beurteilung und speziell zur Kontrolle durch Säulenchromatographi gewonnener Glykosidfraktionen der Einsatz dünnschichtchromato graphischer Methoden geeigneter erschien.

3. Dünnschichtchromatographische Auftrennung in verschiedenen Fließmittelsystemen

Die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen der ADONIS-Glykoside erfolgte auf Kieselgel GF_{254}-Fertigplatten der Firma MERCK. Aufgrund der großen Zahl der Cardenolide sowie der Polaritätsspanne zwischen Aglyka und Primärglykosiden war es erforderlich, mehrere Fließmittelsysteme einzusetzen. Als Standardfließmittel verwendeten wir zur Überprüfung von ADONIS-Extrakten sowie zur Fraktionskontrolle bei säulenchromatographischen Trennungen die Systeme Chloroform-Methanol-Wasser (85+14+1) (I), Chloroform-Methanol-Wasser (80+19+1) (II) und Methyläthylketon-Toluol-Wasser-Methanol-Eisessig (40+5+3+2,5+1) (III).

Die Detektion der Cardenolide erfolgte nach 10minütigem Trocknen der Platten im Trockenschrank bei 105 °C. Hierzu wurden die noch heißen Platten mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz besprüht, worauf die Cardenolide je nach Konstitution ihrer Aglyka unterschiedliche Färbungen zeigten (s. exp. Teil II.6.c Seite 137). Zur Identifizierung unbekannter Substanzen hat es sich bewährt, zunächst die erkalteten Platten mit KEDDE-Reagenz [22] und nach erneutem Erhitzen mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz zu besprühen. Diese Methode bietet den Vorteil einer selektiven Erfassung der Cardenolide, da Vanillin-Schwefelsäure allein ein relativ unspezifisches Sprühreagenz darstellt.

Das in Abb. 9 wiedergegebene Dünnschichtchromatogramm zeigt die Auftrennung des Chloroform-Isopropanol (3+2)-Extraktes im System I. Hieraus ist zunächst eine gute Auftrennung der schwach polaren Komponenten des Extraktes im Bereich des Cymarins und des Strophanthidins zu erkennen, während die stark polaren

Glykoside, wie das k-Strophanthosid und das k-Strophanthin-ß aus dem Strophanthin-Gemisch, kaum die Startlinie verlassen haben. Weiterhin konnten in diesem System die drei blau gefärbten Flecke, bei denen es sich nicht um Cardenolide handelt, abgetrennt werden. Die mit Vanillin-Schwefelsäure erhaltenen Färbungen deuten darauf hin, daß zumindest die den grünen Flecken zuzuordnenden Glykoside vom gleichen Aglykon, dem Strophanthidin, abgeleitet sind.

Eine Differenzierung zwischen roter, rotvioletter und blauvioletter Färbung ist insofern schwieriger, als Intensität und Farbtiefe stark konzentrationsabhängig sind.

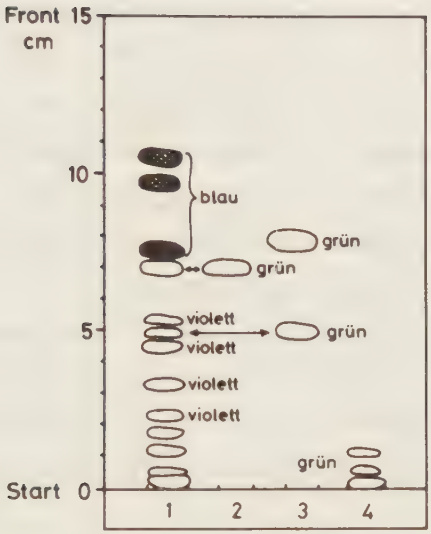


Abbildung 9 : Chromatographische Auftrennung der schwach polaren Glykoside aus dem Chloroform-Isopropanol (3+2)-Extrakt
Schicht: Kieselgel GF_{254}-Fertigplatte
Fließmittel: Chloroform-Methanol-Wasser (85+14+1) System I
Anfärbung: Vanillin-H_2SO_4

1 = Chloroform-Isopropanol (3+2)-Extrakt
2 = Cymarin
3 = Spaltprodukt aus Cymarin nach MANNICH und SIEWERT [24]
4 = k-Strophanthin

In Abb. 10 ist die Auftrennung des Chloroform-, Chloroform-Äthanol (2+1)- und des Chloroform-Äthanol (3+2)-Extraktes im System III wiedergegeben. Hieraus wird deutlich, daß dieses System vornehmlich zur Trennung der mittel bis stark polaren Glykoside verwendbar ist. Die Cardenolide Cymarin und Strophanthidin laufen ungetrennt in Frontnähe und sind teilweise von Ballaststoffen überdeckt. Weiterhin ist eine so starke Überlagerung der Glykosidspektren der einzelnen Extrakte festzustellen, daß der Chloroform-Äthanol (2+1)-Extrakt eine qualitativ ähnliche Zusammensetzung aufweist wie der Chloroform-Äthanol (3+2)-Extrakt.

Zur Überprüfung der Einheitlichkeit chromatographisch gereinigter Substanzen wurden zusätzlich je nach Polarität die Fließmittel Chloroform-Isopropanol (2+1) und Essigester-Pyridin-Wasser (5+1+4), das entspricht den Systemen IV und V, eingesetzt.

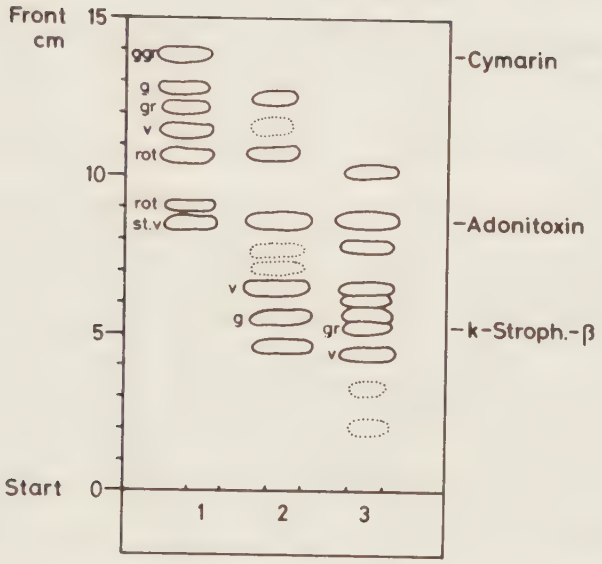


Abbildung 10 : Chromatographischer Vergleich der Glykosid-Extrakte

Schicht: Kieselgel GF_{254}-Fertigplatte

Fließmittel: Methyläthylketon-Toluol-Wasser-Methanol-Eisessig (40+5+3+2,5+1) nach GÖRLICH [16] System III

Anfärbung: Vanillin-H_2SO_4

v = violett, g = grau, gr = grün

1 = Chloroform-Extrakt

2 = Chloroform-Äthanol (2+1)-Extrakt

3 = Chloroform-Äthanol (3+2)-Extrakt

4. Säulenchromatographie an Kieselgel (SC 1 und SC 2)

Die präparative Auftrennung von ADONIS-Extrakten zur Isolierung unbekannter Substanzen erfolgte bisher zumeist durch säulenchromatographische Trennungen an Kieselgel, Cellulose oder Aluminiumoxid. Dabei ist es unerläßlich, zur Ermittlung des jeweils günstigsten Sorptionsmittels und der optimalen mobilen Phase Vorversuche mit geringen Extraktmengen durchzuführen.

Erste orientierende Untersuchungen nahmen wir daher mit dem Gesamtglykosidextrakt eines ADONIS-Konzentrates vor, dessen Gesamtglykosidgehalt, berechnet als Adonitoxin, mit 560 mg/ 100 ml ermittelt wurde (s. exp. Teil I.1., Seite 122). Als Sorptionsmittel diente ein nach der Vorschrift von STOLL und Mitarbeitern [25] hergestelltes Kieselgel (s. exp. Teil II.5.a , Seite 130), das von den Autoren zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von SCILLA-, DIGITALIS- und STROPHANTHUS-Glykosiden verwendet wurde.

Die Überprüfung der säulenchromatographischen Trennung (SC 1) von 56 mg Gesamtglykosiden mit Toluol-Methyläthylketon (1+1) als mobiler Phase wurde dünnschichtchromatographisch in den Systemen I und II vorgenommen. Von den 30 aufgefangenen Fraktionen waren die Fraktionen 1 - 10 in abnehmender Intensität gelb gefärbt, die folgenden waren farblos. Die Fraktionskontrolle ließ keinerlei Auftrennung des Glykosidkomplexes durch SC 1 erkennen. Das gesamte Glykosidspektrum war bereits in der ersten Fraktion und in den folgenden in abfallender Konzentration enthalten.

In einem weiteren Vorversuch (SC 2) sollte geprüft werden, welchen Einfluß der Zusatz von Wasser zum Sorptionsmittel und zur mobilen Phase auf die Qualität der Trennung ausübt. Zu diesem Zweck wurde die Chromatographie von 56 mg Gesamtglykosiden an wassergesättigtem Kieselgel durchgeführt. Als mobile Phase kam wassergesättigtes Toluol-Methyläthylketon (1+1) zum Einsatz.

Die aufgefangenen 30 Fraktionen waren nahezu farblos, die gelbgefärbten Ballaststoffe blieben im oberen Teil der Säule zurück. Aus der Fraktionskontrolle war eine Fraktionierung der Cardenolide in größere Gruppen ersichtlich, wobei Hauptglykoside wie Cymarin und Adonitoxin in einer Gruppe auftraten.

Die Auftrennung der schwach bis mittel polaren Glykoside und damit eine Isolierung von unbekannten Cardenoliden ähnlicher Polarität erschien unter den genannten Bedingungen nicht möglich.

5. Säulenchromatographie an Aluminiumoxid zur Isolierung von Cardenoliden (SC 3 - SC 6)

Zur Isolierung von Strophanthidin durch KOLESNIKOV und BUGRIM (1960) [13] und Strophanthidinfucosid durch WICHTL, JENTZSCH und TÜRK (1971) [18] hat sich die Adsorptionschromatographie an Aluminiumoxid mit Chloroform-Methanol-Gemischen als mobiler Phase gut bewährt. In einem weiteren Vorversuch zur geplanten Auftrennung größerer Extraktmengen sollte zunächst ein Überblick über die Trennleistung und

Kapazität eines solchen Systems gewonnen und gleichzeitig die Isolierung von Adonitoxin als Vergleichssubstanz angestrebt werden.

a) Isolierung von Adonitoxin aus dem Chloroform-Äthanol (2+1)-Extrakt (SC 3)

Als Ausgangsmaterial zur Isolierung des Adonitoxins diente der Chloroform-Äthanol (2+1)-Extrakt des bei SC 1 und SC 2 verwendeten ADONIS-Konzentrates mit einem Gesamtglykosidgehalt von 0,56 g / 100 ml. 400 mg Extrakt, entsprechend 120 mg Glykosiden, wurden in Chloroform-Methanol (1+1) gelöst und auf die Säule aufgetragen (s. exp. Teil II.5.b SC 3, Seite 131).

Zunächst erfolgte mit Chloroform eine Abtrennung der Ballaststoffe, die als gelb gefärbte Zone aus der Säule traten. Darauf wurden die schwach polaren Glykoside durch Zusatz von 5 % bzw. 20 % Methanol in der mobilen Phase eluiert. In den 35 aufgefangenen Fraktionen waren anhand dünnschichtchromatographischer Kontrolle im System III zwischen zwei und drei Cardenolide je Fraktion nachweisbar. Bei einer Steigerung des Methanolanteils auf 30 % trat ein Gemisch von drei Glykosiden aus der Säule, von denen eines eine intensiv grüne Färbung mit Vanillin-Schwefelsäure ergab. Dieses Glykosid ließ sich dünnschichtchromatographisch über 25 Fraktionen verfolgen.

Unmittelbar darauf verließ Adonitoxin als Hauptkomponente eines Gemisches von drei Cardenoliden die Säule und war in insgesamt 35 Fraktionen nachweisbar. Die Adonitoxin enthaltenden Fraktionen wurden zu einer Sammelfraktion vereinigt,

die neben Adonitoxin drei weitere Glykoside aufwies, von denen eines wiederum eine intensiv grüne Färbung mit Vanillin-Schwefelsäure zeigte. Aufgrund seines chromatographischen Verhaltens war dieses Glykosid als das von WICHTL, JENTZSCH und TÜRK [18] aufgeklärte Strophanthidinfucosid anzusprechen.

Nach dünnschichtchromatographischer Reinigung im System III wurde ein amorpher Rückstand von einheitlichem Adonitoxin (ca. 1 mg) erhalten.

b) Auftrennung größerer Mengen Chloroform-Äthanol (2+1)-Extrakt zur Isolierung unbekannter Cardenolide (SC 4)

Zur Auftrennung größerer Mengen von Glykosiden unter Berücksichtigung des Ergebnisses von SC 3 diente der Chloroform-Äthanol (2+1)-Extrakt eines ADONIS-Konzentrates mit einem Gesamtglykosidgehalt von 0,62 g / 100 ml. Etwa 3,2 g Extrakt, entsprechend 1,3 g Glykosiden, wurden in Chloroform-Methanol (1+1) gelöst auf die Säule gebracht (s. exp. Teil II.5.b SC 4, Seite 132).

Die Elution wurde zur Entfernung von Ballaststoffen mit Chloroform begonnen. Nach dem Ablaufen einer gelb gefärbten Zone setzten wir der mobilen Phase 1 % Methanol zu, worauf zunächst eine Substanz aus der Säule trat, die mit Vanillin-Schwefelsäure eine violette, mit KEDDE-Reagenz [22] jedoch keine Färbung ergab.

Als erstes Cardenolid konnte Strophanthidin in den Fraktionen 21 - 45 nachgewiesen werden. Ein weiteres Herzglykosid trat neben dem Strophanthidin ab Fraktion 26 aus der

Säule und endete ebenfalls in Fraktion 45. Aufgrund seiner blaugrauen Färbung mit violettem Hof durch Vanillin-Schwefelsäure soll es im Folgenden als Glykosid "blau" bezeichnet werden.

Bei Erhöhung des Methanolanteils auf 2 % war in der Fraktionskontrolle neben geringen Mengen Strophanthidin ein Cardenolid nachzuweisen, das wegen seiner Grünfärbung mit dem Sprühreagenz als Strophanthidinabkömmling anzusprechen war und als Glykosid "grün I" bezeichnet werden soll. Insgesamt war dieses Glykosid in 30 Fraktionen enthalten.

Trotz weiterer Steigerung des Methanolgehaltes auf 5 % bzw. 20 % waren in den folgenden 35 Fraktionen keine Cardenolide nachzuweisen.

Bei einem Methanolanteil von 30 % trat mit den Fraktionen 16 - 46 ein Glykosid aus der Säule, das bei der Fraktionskontrolle in System III mit Vanillin-Schwefelsäure gleiche intensive Grünfärbung aufwies wie Strophanthidin und Glykosid "grün I". Daher soll dieses Glykosid im Folgenden als Glykosid "grün II" bezeichnet werden.

Wie schon bei SC 3 war auch in SC 4 das Adonitoxin unmittelbar im Anschluß an Glykosid "grün II" als Hauptkomponente eines Gemisches von drei Cardenoliden dünnschichtchromatographisch nachweisbar.

Entsprechend der Fraktionskontrolle wurden Fraktionen gleicher Zusammensetzung zu Sammelfraktionen vereinigt (SF 1 - 4). Die chromatographische Überprüfung der Fraktionsrückstände (Lösungen annähernd gleicher Konzentration in Chloroform-Methanol [1+1]) ließ erkennen, daß in SF 1 (1 % Methanol

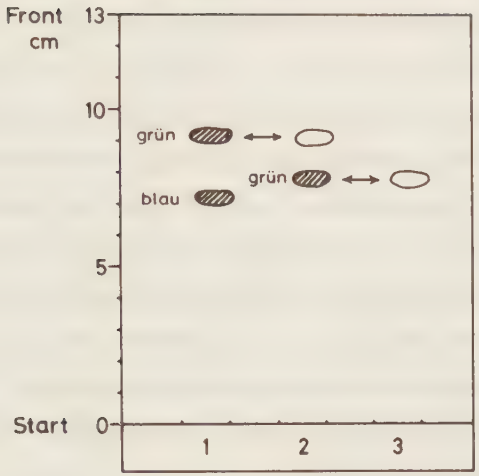


Abbildung 11 : Dünnschichtchromatographische Trennung der Sammelfraktionen 1 - 3 aus SC 4
Schicht: Kieselgel GF_{254}-Platte, selbstbeschichtet
Fließmittel: Chloroform-Methanol-Wasser (80+19+1) System II
Anfärbung: Vanillin-Schwefelsäure, starke Flecken schraffiert
1 = SF 1 (1 % Methanol Frkt. 27 - 45)
2 = SF 2 (2 % Methanol Frkt. 1 - 15)
3 = SF 3 (2 % Methanol Frkt. 16 - 30)

Frkt. 27 - 45) Strophanthidin und Glykosid "blau" zu etwa gleichen Teilen, in SF 2 (2 % Methanol Frkt. 1 - 15) neben wenig Strophanthidin die Hauptmenge an Glykosid "grün I" und in SF 3 (2 % Methanol Frkt. 16 - 30) ausschließlich Glykosid "grün I" enthalten war. Die Abb. 11 gibt den Trennverlauf von SF 1 - 3 im System II wieder.

In SF 4 (30 % Methanol Frkt. 16 - 46) war neben geringen Mengen eines weiteren Cardenolides der Hauptanteil an Glykosid "grün II" nachzuweisen.

Da alle Fraktionen aufgrund größerer Anteile an Ballaststoffen dunkelbraun gefärbt waren und nach präparativer Schichtchromatographie (s. exp. Teil II.2., Seite 127) nur amorphe Rückstände zwischen 2 - 3 mg resultierten, war es erforderlich, eine weitere säulenchromatographische Trennung noch größerer Mengen an Chloroform-Äthanol (2+1)-Extrakt anzuschließen. Die in geringen Mengen erhaltenen, amorphen Glykoside sollten indessen zu chromatographischen Vergleichen mit authentischen Substanzen herangezogen werden.

c) Isolierung größerer Mengen der Glykoside "blau", "grün I" und "grün II" aus Chloroform-Äthanol (2+1)-Extrakt (SC 5)

SC 5 sollte gezielt zur Isolierung der Glykoside "blau", "grün I" und "grün II" eingesetzt werden, um physikochemische Daten dieser unbekannten Cardenolide ermitteln zu können. Dabei war vor allem auf gleiche Selektivität der Säule im Vergleich zu SC 4 Wert zu legen, da eine dünnschichtchromatographische Auftrennung von Glykosid "grün II" und Adonitoxin in keinem der von uns untersuchten Systeme zufriedenstellend gelungen war. Daher mußte das Verhältnis von Sorbens zur eingesetzten Glykosidmenge und damit auch zur Fraktionsgröße konstant gehalten werden, um eine gleich gute Trennleistung wie in SC 3 und SC 4 zu gewährleisten.

Bei einem Einsatz von 5,2 g Glykosiden eines Chloroform-Äthanol (2+1)-Extraktes aus 3,5 l eines ADONIS-Konzentrates mit einem Gesamtglykosidgehalt von 0,39 g / 100 ml betrug demnach die Fraktionsgröße 2,5 l. Um den Arbeits- und Zeitaufwand so gering wie möglich zu halten wurden die Fraktionen mit Hilfe eines umgebauten Fraktionssammlers vom Typ Fraktomat Y-3 der Firma HAKO aufgefangen (s. exp. Teil II.5.b, Seite 134). Die erhaltenen Fraktionen engten wir so rasch wie möglich unter vermindertem Druck zur Trockne ein, um die Menge an in Umlauf befindlichen Lösungsmitteln auf ein Mindestmaß zu reduzieren. Die abdestillierten organischen Phasen wurden erneut zur Elution eingesetzt, nachdem sie durch Methanolzusatz auf die jeweils erforderliche Dichte eingestellt worden waren. Die Überprüfung der Dichte erfolgte unter Zuhilfenahme eines geeigneten Aräometers.

Die Elution erfolgte wiederum mit Chloroform und darauf mit steigendem Methanolanteil in der mobilen Phase. Bei der Fraktionskontrolle der Fraktionen mit 1 % bzw. 2 % Methanolzusatz im System II zeigte sich, daß Strophanthidin in Spuren und die Glykoside "blau" und "grün I" nur in geringen Mengen nachzuweisen waren (Glykosid "blau" 1 % Methanol Frkt. 19 - 28, Glykosid "grün I" 2 % Methanol Frkt. 3 - 10). Da im Chloroform-Extrakt größere Mengen an Strophanthidin aufzufinden waren, stand zu vermuten, daß sich die Hauptmenge der gesuchten Glykoside ebenfalls im Chloroform-Extrakt befinden könne. Ein Nachweis der beiden Glykoside aus den Extrakten nach papier- oder dünnschichtchromatographischer Auftrennung ist infolge des geringen Anteils am Gesamtglykosidgehalt nicht möglich.

Glykosid "grün II" trat in den Fraktionen 12 - 52 bei einem Methanolzusatz von 30 % aus der Säule. Daraus wurden zwei Sammelfraktionen erhalten, von denen die erstere (Frkt. 12 - 30 einen Rückstand von ca. 130 mg und größere Mengen an Ballaststoffen aufwies, während die zweite (Frkt. 31 - 52) ein weiteres Cardenolid enthielt und einen Rückstand von ca. 80 mg ergab.

d) Auftrennung des Chloroform-Extraktes zur Isolierung der Glykoside "blau" und "grün I"; die Glykoside "grau I" und "grau II" (SC 6)

Die bei SC 5 eingesetzte Aluminiumoxidsäule wurde auch zur Auftrennung des Chloroform-Extraktes verwendet, um den materiellen Aufwand so gering wie möglich zu halten. Die Fraktionsgröße von 2,5 l hielten wir aus technischen Gründen ebenfalls bei. Nachdem die Säule mit insgesamt 50 l Benzol-Chloroform (1+1) gewaschen worden war, konnte der Extrakt (entsprechend 2,1 g Glykosiden) in wenig Chloroform gelöst aufgebracht werden.

Die Elution wurde mit Benzol-Chloroform (1+1) begonnen, wobei sich eine von Chlorophyll grün gefärbte Zone ablöste und aus der Säule trat. Cardenolide waren in den ersten 20 Fraktionen nicht enthalten.

Bei Verwendung von reinem Chloroform als mobile Phase konnte in den Fraktionen 1 - 22 die Hauptmenge an Cymarin eluiert werden. Neben Cymarin traten ab Fraktion 9 zwei

weitere Cardenolide aus der Säule, die bei der Fraktionskontrolle in System I mit Vanillin-Schwefelsäure eine graue Färbung annahmen und bis einschließlich Fraktion 26 nachweisbar waren. Da die folgenden Fraktionen größere Mengen an Ballaststoffen enthielten, wurde der mobilen Phase erst nach insgesamt 50 Fraktionen 1 % Methanol zugesetzt. Darauf ließen sich in den Fraktionen 27 - 44 größere Mengen Glykosid "blau" und zusätzlich ab Fraktion 35 Strophanthidin nachweisen.

Nach Erhöhen des Methanolanteils auf 2 % trat neben geringen Anteilen an Strophanthidin Glykosid "grün I" in den Fraktionen 6 - 23 aus der Säule.

Aus SC 6 resultierten drei Sammelfraktionen: SF 1 = Chloroform Frkt. 9 - 26 (ca. 240 mg), SF 2 = 1 % Methanol Frkt. 27 - 44 (ca. 210 mg) und SF 3 = 2 % Methanol Frkt. 6 - 23 (ca. 200 mg).

C. Vergleichende chromatographische Untersuchungen der durch SC 4 isolierten Glykoside "grün I" und "grün II" mit Extrakten aus STROPHANTHUS KOMBE und STROPHANTHUS HISPIDUS im Hinblick auf in ihnen enthaltene Strophanthidinglykoside

Aufgrund ihrer Farbreaktion mit Vanillin-Schwefelsäure erschien die Vermutung naheliegend, daß es sich bei den durch SC 4 erhaltenen Glykosiden "grün I" und "grün II" um Strophanthidinabkömmlinge handeln könne. Daher sollten zur Ermittlung der Identität neben der angestrebten Charakterisierung durch physikochemische Daten zunächst auch papier- und dünnschichtchromatographische Vergleiche mit Strophanthus-Extrakten und authentischen Strophanthidinglykosiden herangezogen werden. Hierzu standen Samen von STROPHANTHUS KOMBE und STROPHANTHUS HISPIDUS sowie die Glykoside k-Strophanthosid, k-Strophanthin-ß, Helveticosid und Cymarin zur Verfügung.

1. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen

Die dünnschichtchromatographische Auftrennung der Chloroform-Isopropanol (3+2)-Extrakte aus STROPHANTHUS KOMBE und STROPHANTHUS HISPIDUS erfolgte in den Systemen II und III. Durch Cochromatographie mit authentischen Substanzen konnten in beiden Extrakten die Cardenolide k-Strophanthosid, k-Strophanthin-ß, Helveticosid, Strophanthidin und Cymarin identifiziert werden (Strophanthidin war nach saurer Hydrolyse aus Cymarin zugänglich).

Glykosid "grün I" wurde zum Vergleich mit den Cardenoliden der beiden STROPHANTHUS-Extrakte im System II, Glykosid "grün II" im System III chromatographiert. Aus den besprühten Chromatogrammen war ersichtlich, daß in den Extrakten beider STROPHANTHUS-Arten ein Cardenolid mit ähnlicher Laufstrecke wie Glykosid "grün II" fehlte. Hingegen wies der Extrakt aus STROPHANTHUS HISPIDUS ein Cardenolid mit identischem R_f-Wert wie Glykosid "grün I" und gleicher intensiv grüner Färbung auf. An dieser Stelle war im Extrakt aus STROPHANTHUS KOMBE kein Herzglykosid nachzuweisen.

Das zunächst als Glykosid "x" bezeichnete Cardenolid aus STROPHANTHUS HISPIDUS schien aufgrund des chromatographischen Bildes einen höheren Anteil am Gesamtglykosidgehalt zu besitzen als Glykosid "grün I" aus ADONIS VERNALIS.

Um bei der geplanten Isolierung eine zu hohe Belastung des noch auszuwählenden Systems zu umgehen, wurde das Glykosidspektrum durch Ausschütteln mit Chloroform, Chloroform-Äthanol (2+1) und Chloroform-Äthanol (3+2) analog der für ADONIS-Konzentrate beschriebenen Vorschrift in drei Glykosidfraktionen aufgeteilt (s. exp. Teil I.1., Seite 123). Das in Abb. 12 wiedergegebene Chromatogramm zeigt die dünnschichtchromatographische Kontrolle der Extrakte im System II. Hieraus ist zu ersehen, daß durch Überlagerung der Glykosidspektren ähnlich den ADONIS-Extrakten Glykosid "x" zu etwa gleichen Anteilen im Chloroform- und im Chloroform-Äthanol (2+1)-Extrakt nachzuweisen war. Zur Isolierung des Glykosides sollte nun zunächst ein geeignetes System durch orientierende chromatographische Untersuchungen ermittelt werden.

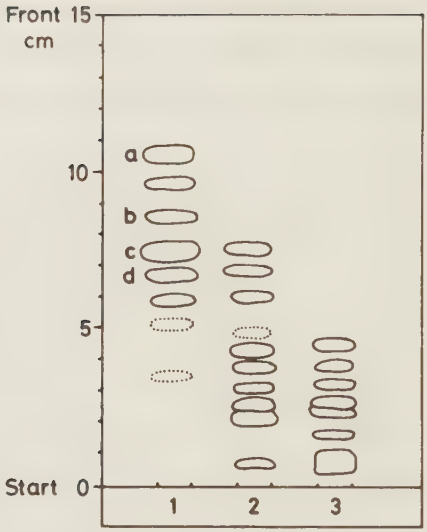


Abbildung 12 : Dünnschichtchromatographische Kontrolle der Extrakte aus STROPHANTHUS HISPIDUS
Schicht: Kieselgel GF_{254}-Fertigplatte
Fließmittel: Chloroform-Methanol-Wasser (80+19+1) System II
Anfärbung: Vanillin-H_2SO_4

1 = Chloroform-Extrakt
2 = Chloroform-Äthanol (2+1)-Extrakt
3 = Chloroform-Äthanol (3+2)-Extrakt

identifiziert wurden nur die grün anfärbbaren Flecken im Chloroform-Extrakt:

a = Cymarin, b = Strophanthidin,
c = Helveticosid, d = Glykosid "x"

2. Papierchromatographische Trennungen der schwach bis mittel stark polaren Glykoside

Das zur Isolierung von Glykosid "x" auszuwählende System sollte einerseits eine gute Auftrennung bei geringem Zeitaufwand, andererseits eine hohe Belastbarkeit bieten. Da diese beiden Forderungen für eine papierchromatographische Trennung sprachen, wurden zunächst drei Fließmittel auf ihre Eignung zur Auftrennung der schwach bis mittel stark polaren Glykoside überprüft. Hierzu chromatographierten wir den Chloroform- und den Chloroform-Äthanol (2+1)-Extrakt in den Systemen Chloroform-Tetrahydrofuran-Formamid (50+50+6,5), Benzol-Tetrahydrofuran (1+1) und Xylol-Methyläthylketon, formamidgesättigt. Bei allen drei Systemen waren die Papiere SCHLEICHER und SCHÜLL 2043 b Mgl zu 33 % mit Formamid imprägniert.

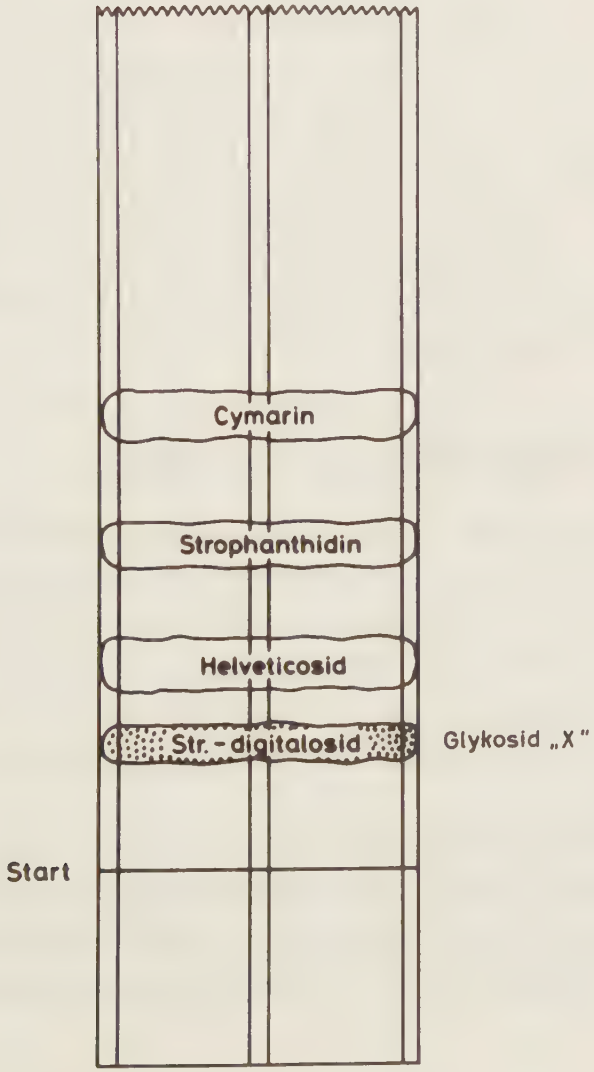
Im System Benzol-Tetrahydrofuran (1+1) (III) erzielten wir bei einer Laufzeit von 7 Stunden (Durchlaufchromatogramm) eine ausgezeichnete Trennung des Chloroform-Extraktes in vier Glykosidzonen. Aus diesem Grunde sollte die Isolierung von Glykosid "x" durch präparative Papierchromatographie aus dem Chloroform-Extrakt im genannten System III erfolgen.

3. Isolierung von Glykosid "x" aus STROPHANTHUS HISPIDUS durch präparative Papierchromatographie

Die Herstellung des Chloroform-Extraktes erfolgte aus 50 g gemahlenen und entfetteten Samen von STROPHANTHUS HISPIDUS. Der Rückstand entsprach einem Gehalt von ca. 350 mg Glykosiden, (berechnet als Adonitoxin, um einen Vergleich mit analog hergestellten ADONIS-Extrakten zu erhalten).

Zur Trennung waren insgesamt 60 Papierchromatogramme erforderlich, da die Trennleistung durch den hohen Anteil an Helveticosid auf ca. 6 mg Glykoside je Chromatogramm begrenzt war (s. exp. Teil II.4., Seite 129). Nach der Elution der dem Glykosid "x" entsprechenden Chromatogrammzonen resultierte ein Rückstand von ca. 80 mg, der braun gefärbt war. In Abb. 13 ist die papierchromatographische Trennung dargestellt, wobei Glykosid "x" der Zone des als Strophanthidindigitalosid identifizierten Glykosides entspricht (s. D.2., Seite 57). Hier wie auch im Folgenden erfolgt die Darstellung der durchweg absteigend entwickelten Papierchromatogramme, wie sie zur Bearbeitung vorgelegen haben (Fließmittelfront am oberen Bildrand).

Abbildung 13 : Präparative Papierchromatographie des Chloroform-Extraktes von STROPHANTHUS HISPIDUS
Fließmittel: System III, Anfärbung: Antimontrichlorid-Reagenz, alle Zonen grün gefärbt
Strophanthidindigitalosid = Glykosid "x"



D. Aufarbeitung, Reinigung und Charakterisierung der isolierten Glykoside

Zur Charakterisierung der Glykoside "blau", "grün I", "grün II", "grau I" und "grau II" aus ADONIS VERNALIS sowie von Glykosid "x" aus STROPHANTHUS HISPIDUS war zunächst die Abtrennung von Begleitsubstanzen aus den Sammelfraktionen erforderlich. Diese Isolierung und Anreicherung der Glykoside erfolgte ausschließlich auf dünnschichtchromatographischem Wege im jeweils geeigneten Fließmittelsystem und je nach Trennproblem auf Kieselgel GF_{254}-Platten von 0,25 - 0,5 mm Schichtdicke. Die Beurteilung der reinen, kristallinen oder amorphen Cardenolide nahmen wir nach chromatographischen und physikochemischen Kriterien vor.

1. Identifizierung von Glykosid "grün I"

Glykosid "grün I" wies stärker polaren Charakter auf als Helveticosid und war aufgrund seiner chromatographischen Eigenschaften als Monoglykosid anzusprechen. Im Gegensatz zu Helveticosid ergab Glykosid "grün I" keine positive Xanthydrolreaktion, so daß es sich bei der Zuckerkomponente nicht um einen 2-Desoxy- bzw. 2,6-Didesoxy-Zucker handeln konnte.

Um Aufschluß über die Identität des Aglykons und des Zuckers zu erhalten, wurde 1 mg Glykosid durch saure Hydrolyse gespalten (s. exp. Teil II.7., Seite 139). Aus dem Rückstand der organischen Phase konnte durch Cochromatographie

in System I mit authentischem Material Strophanthidin als Aglykon nachgewiesen werden. Beim Vergleich der Zuckerkomponente mit Glucose und Rhamnose im System VI Essigester-Isopropanol-Methanol (70+15+15) wurde erwartungsgemäß nur ein Zucker mit größerer Laufstrecke als Rhamnose aufgefunden.

Einer Untersuchung von LICHTI, TAMM und REICHSTEIN (1956) [26] zufolge war in den Samen von STROPHANTHUS LEDIENII ein Glykosid in geringen Mengen enthalten, das durch chromatographische Methoden als Strophanthidindigitalosid identifiziert werden konnte. Da die Isolierung unter ähnlichen Bedingungen erfolgt war (Trennung an Aluminiumoxid, 1 % Methanol in Chloroform als mobile Phase) wie die von Glykosid "grün I" und sich im papierchromatographischen Verhalten ebenfalls Übereinstimmungen ergaben, nahmen wir einen dünnschichtchromatographischen Vergleich mit authentischer Digitalose vor. Die Trennung wurde im System VI auf einer selbstbeschichteten, luftgetrockneten Kieselgel GF_{254}-Platte durchgeführt. Digitalose war zusammen mit Glucose durch saure Hydrolyse von Glucoverodoxin zugänglich. Zur Orientierung wurden hier wie bei allen folgenden dünnschichtchromatographischen Untersuchungen von Zuckern Glucose und Rhamnose mitchromatographiert.

Nach dem Besprühen der Platte mit 4-Aminohippursäure-Phthalsäure-Reagenz und anschließendem Erhitzen auf 120 °C waren die Zucker als gelbe Flecken sichtbar. Infolge der geringen Aktivität der Platte waren jedoch Digitalose und der Zucker aus Glykosid "grün I" in Frontnähe gelaufen. Daher war keine weitere Aussage zu treffen, als daß Digitalose

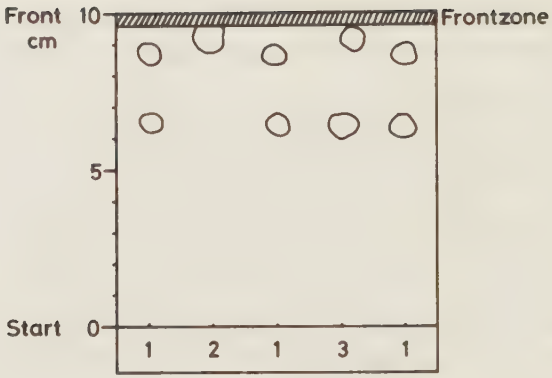


Abbildung 14 : Dünnschichtchromatographischer Vergleich des Zuckers aus Glykosid "grün I" mit Digitalose
Schicht: Kieselgel GF_{254}-Platte, selbstbeschich
Fließmittel: Essigester-Isopropanol-Methanol (70+15+15) System VI
Anfärbung: 4-Aminohippursre.-Phthalsre.
1 = Glucose und Rhamnose, 2 = Zucker aus Glykosid "grün I", 3 = Glucose und Digitalose aus Glucoverodoxin

ebenfalls einen größeren R_f-Wert aufwies als Rhamnose. Glucose aus Glucoverodoxin zeigte gleiche Laufstrecke wie der authentische Zucker.

Ein weiterer chromatographischer Vergleich wurde darauf im gleichen System auf einer Kieselgel GF_{254}-Fertigplatte durchgeführt.Hier ergaben Rhamnose, Digitalose und der Zucker aus Glykosid "grün I" langgestreckte Flecken, während Glucose am Start zurückblieb. Digitalose und der Zucker aus Glykosid "grün I" wiesen gleiche Laufstrecken auf. Die Abb. 14 und 15 veranschaulichen die dünnschichtchromatographischen Vergleiche

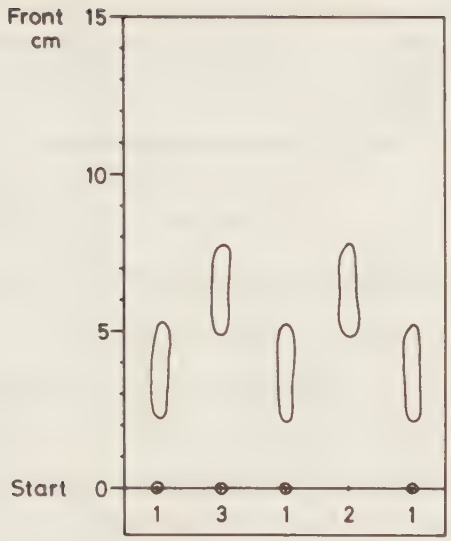


Abbildung 15 : Dünnschichtchromatographischer Vergleich des Zuckers aus Glykosid "grün I" mit Digitalose
Schicht: Kieselgel GF_{254}-Fertigplatte
Fließmittel: Essigester-Isopropanol-Methanol (70+15+15) System VI
1 = Glucose und Rhamnose, 2 = Zucker aus Glykosid "grün I", 3 = Glucose und Digitalose aus Glucoverodoxin

Zur Absicherung des Ergebnisses der dünnschichtchromatographischen Vergleiche wurde eine papierchromatographische Überprüfung im System IV Toluol-Butanol-Wasser (1+1+2) (Durchlaufchromatogramm, 50 Stunden) vorgenommen. Nach dem Besprühen mit 4-Aminohippursäure-Phthalsäure-Reagenz [27] waren die Zucker als gelbe Flecken sichtbar, die im UV-Licht bei 366 nm intensiv gelb fluoreszierten. Auch hier waren die R_f-Werte

Abbildung 16 : Papierchromatographischer Vergleich der Zucker
Fließmittel: System IV, Durchlaufchromatogramm
50 Stunden, Anfärbung: 4-Aminohippursre.-
Phthalsre.
1, 3 und 5 = Glucose und Rhamnose
2 = Glucose und Digitalose aus Glucoverodoxin
4 = Zucker aus Glykosid "grün I"

der Digitalose und des Zuckers aus Glykosid "grün I" identisch. Die Abb. 16 zeigt das Ergebnis der papierchromatographischen Trennung in System IV. Glykosid "grün I" ist demnach Strophanthidindigitalosid.

2. Identifizierung von Glykosid "x" aus STROPHANTHUS HISPIDUS

Glykosid "x" aus STROPHANTHUS HISPIDUS hatte bei vergleichenden dünnschichtchromatographischen Untersuchungen mit Glykosid "grün I" aus ADONIS VERNALIS gleichen R_f-Wert im System II und gleiche intensive Grünfärbung wie dieses mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz ergeben. Es war demnach ebenfalls als Strophanthidinabkömmling und als Monoglykosid anzusprechen.

Aus dem Rückstand der organischen Phasen konnte das Aglykon nach saurer Hydrolyse (s. exp. Teil II.7., Seite 139) durch dünnschichtchromatographischen Vergleich mit dem Genin aus Glykosid "grün I" und authentischer Substanz als Strophanthidin identifiziert werden.

Papier- und dünnschichtchromatographische Vergleiche ergaben wie vermutet das Vorliegen nur eines Zuckers. Darüberhinaus waren die Laufstrecken von Digitalose und den Zuckern aus Glykosid "grün I" und Glykosid "x" bei allen Untersuchungen identisch.

Aufgrund dieser Befunde muß Glykosid "x" aus STROPHANTHUS HISPIDUS mit Glykosid "grün I" aus ADONIS VERNALIS identisch und somit ebenfalls Strophanthidindigitalosid sein.

3. Vergleichende chromatographische Untersuchungen der Glykoside "grün I" und "x" mit authentischem Strophanthidindigitalosid aus STROPHANTHUS LEDIENII

Zur Überprüfung der Identität der von uns durch chromatographische Methoden als Strophanthidindigitalosid charakterisierten Glykoside "grün I" und "x" sollte ein direkter chromatographischer Vergleich mit authentischem Material herangezogen werden.

Hierzu stand uns eine Glykosidfraktion, von LICHTI, TAMM und REICHSTEIN [26] isoliert, zur Verfügung +), die gemäß Deklaration die Cardenolide Emicymarin, B, F und G in Spuren sowie D = Strophanthidindigitalosid und E als Hauptglykoside enthielt (im folgenden auch als Präparat LICHTI bezeichnet).

Der direkte dünnschichtchromatographische Vergleich der Cardenolide des Glykosidgemisches aus STROPHANTHUS LEDIENII mit Glykosid "grün I" aus ADONIS VERNALIS im System II ist in Abb. 17 wiedergegeben.

Hieraus geht zunächst hervor, daß in der Glykosidfraktion aus STROPHANTHUS LEDIENII in der Tat sechs Substanzen vorlagen. Diese ergaben mit KEDDE-Reagenz eine blauviolette Färbung, wobei eine Substanz gleiche Laufstrecke aufwies wie Glykosid "grün I".

+) Herrn Prof. Dr. T. REICHSTEIN danke ich auch an dieser Stelle für die freundliche Überlassung des Präparates.

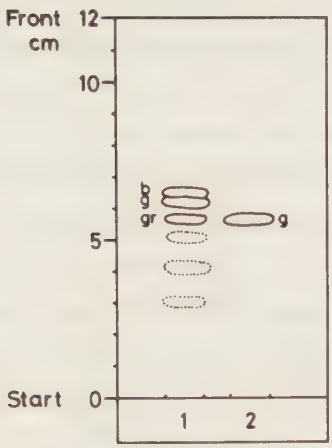


Abbildung 17 : Dünnschichtchromatographischer Vergleich von Glykosid "grün I" aus ADONIS VERNALIS mit authentischem Strophanthidindigitalosid aus STROPHANTHUS LEDIENII
Schicht: Kieselgel GF_{254}-Fertigplatte
Fließmittel: Chloroform-Methanol-Wasser (80+19+1) System II
Anfärbung: Vanillin-Schwefelsäure
1 = Cardenolidgemisch aus STROPHANTHUS LEDIENII B, F, G, D, E und Emicymarin
2 = Glykosid "grün I" aus ADONIS VERNALIS
b = blau, g = grün, gr = grau

Nach dem Besprühen der Platte mit Vanillin-Schwefelsäure war weiterhin zu erkennen, daß der Fleck des Cardenolidgemisches mit gleichem R_f-Wert wie Glykosid "grün I" statt intensiv grüner eine graue Färbung zeigte. Dagegen konnte ein weiterer Fleck mit größerer Laufstrecke aufgrund seiner grünen Farbe als von einem Strophanthidinglykosid stammend an-

gesehen werden; hierbei sollte es sich nach Ansicht von LICHTI um Strophanthidindigitalosid handeln. Der Fleck des unpolarsten Glykosides war blau gefärbt, so daß es sich hierbei um das Periplogeninglykosid Emicymarin handeln mußte. Die Farben der drei weiteren Cardenolide des Gemisches waren infolge der geringen Konzentrationen nicht sicher zu definieren.

Glykosid "grün I" und Glykosid "x" waren aufgrund dünnschichtchromatographischer Vergleiche nicht mit Strophanthidindigitalosid aus STROPHANTHUS LEDIENII identisch.

4. Identifizierung der Glykoside D und E aus STROPHANTHUS LEDIENII; Anmerkungen von Herrn Prof. Dr. T. REICHSTEIN und Herrn Dr. J. v. EUW

Um Gewißheit über die Identität der von uns isolierten Glykoside zu erhalten, war es erforderlich, einen chromatographischen Vergleich der Zuckerkomponenten mit dem Zucker des Strophanthidindigitalosides (Substanz D) aus STROPHANTHUS LEDIENII vorzunehmen, da die Aglyka offensichtlich übereinstimmten.

Da auf eine Isolierung der einzelnen Komponenten des Präparates LICHTI verzichtet werden mußte, es stand nur eine geringe Menge an Material zur Verfügung (ca. 1,5 mg), unterwarfen wir 1 mg des Gemisches der sauren Hydrolyse (s. exp. Teil II.7., Seite 139). Der Rückstand der wäßrigen Phase diente zu papier- und dünnschichtchromatographischen Vergleichen mit authentischer Digitalose und dem Zucker aus Glykosid "grün I".

Die dünnschichtchromatographische Überprüfung der Zucker des Cardenolidgemisches (Präparat LICHTI) im System VI zeigt die Abb. 18:

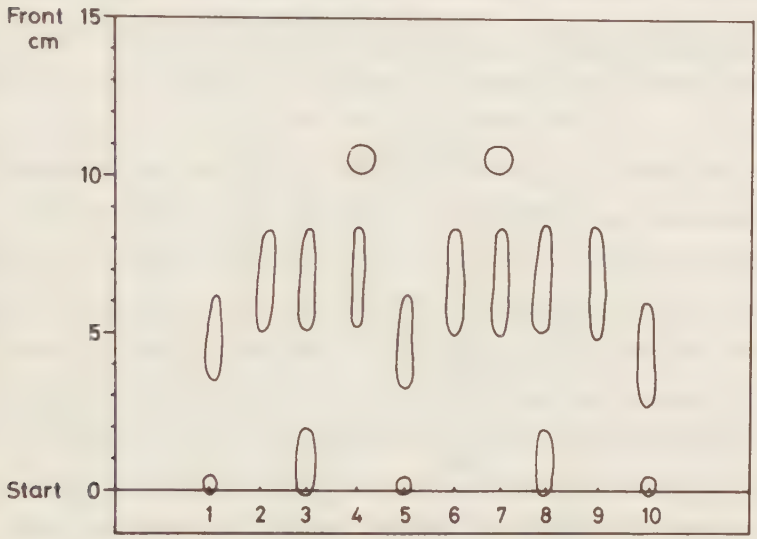


Abbildung 18 : Dünnschichtchromatographische Kontrolle der Zucker des Glykosidgemisches aus STROPHANTHUS LEDIENII

Schicht: Kieselgel GF_{254}-Fertigplatte

Fließmittel: Essigester-Isopropanol-Methanol (70+15+15) System VI

Anfärbung: 4-Aminohippursre.-Phthalsre.-, Xanthydrol-Reagenz

1, 5 und 10 = Glucose und Rhamnose

2, 6 und 9 = Zucker aus Glykosid "grün I"

3 und 8 = Glucose und Digitalose aus Glucoverodoxin

4 und 7 = Zucker des Glykosidgemisches (Präparat LICHTI)

Die Zucker des Glykosidgemisches (Präparat LICHTI) ergaben lediglich zwei Flecken, von denen einer nur im UV-Licht sichtbar ist und gleiche Laufstrecke wie Digitalose aufweist. Der andere Fleck ist kreisrund und im Tageslicht stark braun gefärbt. Hierbei handelt es sich aufgrund einer positiven Xanthydrolreaktion um einen 2-Desoxy- bzw. einen 2,6-Didesoxy-Zucker.

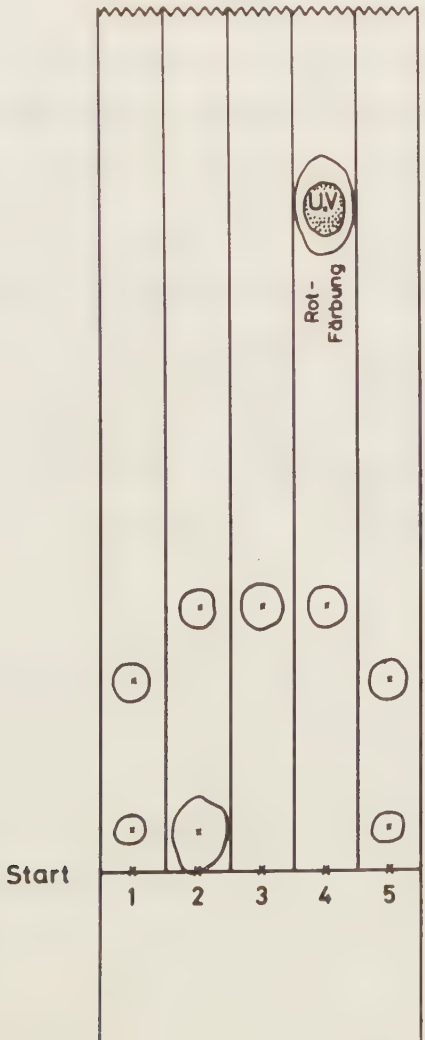
Dieser Befund sprach dafür, daß es sich bei dem Strophanthidinglykosid aus STROPHANTHUS LEDIENII nicht um Strophanthidindigitalosid handelt. Da die Cardenolide D und E zu etwa gleichen Teilen im Gemisch vertreten sind, die Konzentration des Emicymarins erheblich geringer ist, müßte die Hauptkomponente des Zuckergemisches aus Digitalose bestehen. Aufgrund der Tatsache, daß dies nicht der Fall ist, muß einerseits der Digitalosefleck dem Emicymarin zugeschrieben werden, während andererseits die beiden Glykoside D und E, da kein dritter Fleck zu erkennen ist, den gleichen 2-Desoxy- bzw. 2,6-Didesoxy-Zucker aufweisen müssen.

Die papierchromatographische Trennung im System IV bestätigt unseren Befund (s. Abb. 19). Auch hier zeigt die Hauptkomponente des Zuckergemisches eine wesentlich höhere Laufstrecke als die in geringer Menge ebenfalls enthaltene Digitalose und positive Xanthydrolreaktion.

Die chromatographischen Eigenschaften des Strophanthidinglykosides aus STROPHANTHUS LEDIENII (Präparat LICHTI) waren denen von Helveticosid vergleichbar, das darüberhinaus mit Digitoxose auch einen 2-Desoxy-Zucker enthält, also eine

Abbildung 19 : Papierchromatographischer Vergleich des Zuckergemisches aus STROPHANTHUS LEDIENII mit Digitalose und dem Zucker aus Glykosid "grün I"; Fließmittel: System IV, Durchlaufchromatogramm (42 Stunden); Anfärbung: 4-Aminohippursre.-Phthalsre., Xanthydrol-Reagenz

1 und 5 = Glucose und Rhamnose
2 = Glucose und Digitalose aus Glucoverodoxin
3 = Zucker aus Glykosid "grün I"
4 = Zucker des Cardenolidgemisches



positive Xanthydrolreaktion ergibt. Zum Vergleich der beiden Glykoside wurde ein Dünnschichtchromatogramm auf einer Kieselgel GF_{254}-Fertigfolie im System II angefertigt (s. Abb. 20). Nach dem Entwickeln zerteilten wir das Chromatogramm in die Hälften A und B, wobei die Hälfte A zur Detektion mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz und die Hälfte B zur Durchführung der Xanthydrolreaktion diente.

Die unter A abgebildete Chromatogrammhälfte zeigt, daß beide Glykoside identische R_f-Werte aufweisen und mit dem Sprühreagenz gleiche grüne Färbungen ergeben. Die Chromatogrammhälfte B läßt erkennen, daß die Glykoside D und E ebenso wie Helveticosid positive Xanthydrolreaktion zeigten. Damit ist Übereinstimmung mit den vorherigen Untersuchungen hergestellt, die Zucker der Glykoside D und E sind identisch.

Zur sicheren Identifizierung von Glykosid D mit Helveticosid erfolgte zusätzlich ein Vergleich des Zuckers mit authentischer Digitoxose, die durch saure Hydrolyse von Lanatosid C, das in größeren Mengen als Helveticosid zur Verfügung stand, zugänglich war.

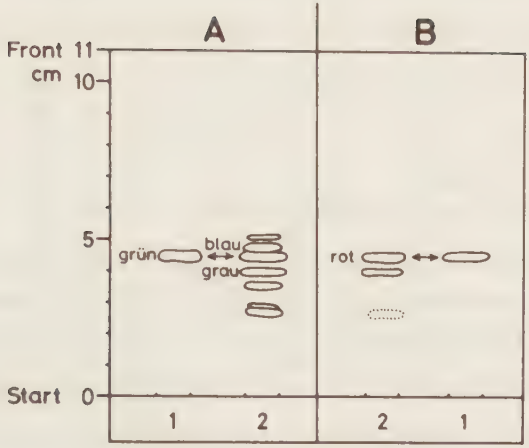


Abbildung 20 : Dünnschichtchromatographische Identifizierung des Strophanthidinglykosides aus STROPHANTHUS LEDIENII
Schicht: Kieselgel GF_{254}-Fertigfolie
Fließmittel: System II Chloroform-Methanol-Wasser (80+19+1)
Anfärbung: A = Vanillin-H_2SO_4,
B = Xanthydrol-Reagenz
1 = Helveticosid, 2 = Gemisch aus STROPHANTHUS LEDIENII

Die Abb. 21 gibt den dünnschichtchromatographischen Vergleich des Zuckergemisches mit Digitoxose wieder. Der Hauptfleck zeigte gleiche Laufstrecke wie authentische Digitoxose, der Fleck der Digitalose war selbst im UV-Licht sehr schwach zu erkennen, da nur mehr geringe Mengen der Zuckerlösung zur Verfügung gestanden hatten.

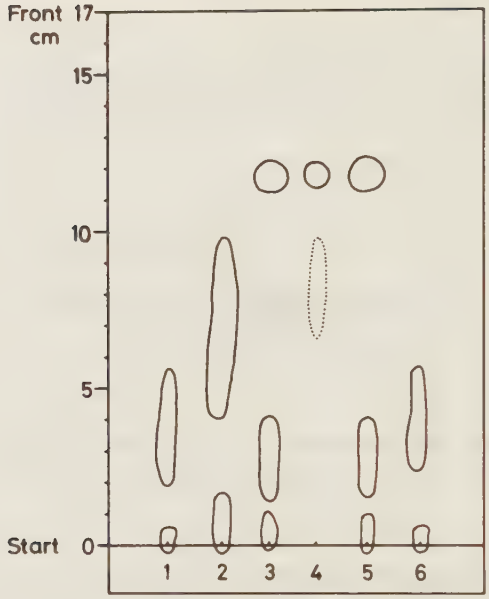


Abbildung 21 : Dünnschichtchromatographischer Vergleich des Zuckergemisches von Präparat LICHTI mit Digitoxose
Schicht: Kieselgel GF_{254}-Fertigplatte
Fließmittel: Essigester-Isopropanol-Methanol (70+15+15) System VI
Anfärbung: 4-Aminohippursre.-Phthalsre., Xanthydrol-Reagenz
1 und 6 = Glucose und Rhamnose, 2 = Glucose und Digitalose aus Glucoverodoxin, 3 und 5 = Glucose und Digitoxose aus Lanatosid C, 4 = Zucker von Präparat LICHTI

Glykosid D aus STROPHANTHUS LEDIENII ist demnach nicht Strophanthidindigitalosid, sondern Helveticosid [28], das zur Zeit der Untersuchungen an STROPHANTHUS LEDIENII noch nicht bekannt war. Glykosid E dürfte mit Helveticosol [29] identisch

sein, da aus dem Gemisch der Aglyka durch dünnschichtchromatographische Vergleiche mit authentischen Geninen Strophanthidin, Periplogenin und Strophanthidol nachgewiesen werden konnte.

Herr Dr. von EUW hatte die Freundlichkeit, das von uns isolierte Strophanthidindigitalosid einer weiteren Überprüfung mit einer zweiten, ebenfalls aus STROPHANTHUS LEDIENII isolierten Glykosidfraktion zu unterziehen. Im Folgenden werden die uns daraufhin übermittelten Anmerkungen von Herrn Dr. von EUW und Herrn Prof. Dr. REICHSTEIN wiedergegeben:

"Auf Anregung von Herrn Prof. Wichtl haben wir zwei der alten Präparate, die Herr Lichti 1956 (loc. cit.) aus STROPHANTHUS LEDIENII isoliert hatte, im PC geprüft. Dies geschah auf Whatman Nr. 1, imprägniert mit 33 % Formamid, Länge vom Start aus 31 cm, Fließmittel Tetrahydrofuran-Benzol-(1:1), Laufzeit 5 Std. = zweimal Front (diese abgetropft). Nachweis mit KEDDE-Reagenz. Zum Vergleich dienten Helveticosid, Helveticosol und Glykosid "G I" (amorph) aus ADONIS VERNALIS. Das früher in sehr kleiner Menge isolierte Präparat aus S. LEDIENII, das nur den D-Fleck gegeben hatte, war damals aufgebraucht worden.

Präp. a (Mischkristallisat) von LICHTI, enthielt nach Etikett 6 Stoffe: (B), Emicymarin, D, E, F, G. In Klammern = schwache, unterstrichen = starke Flekken. Die Kontrolle gab jetzt wieder 6 Flecke mit folgenden Laufstrecken in mm (Mitte Fleck gemessen):

(24), (62), 92 = Helveticosol, 155 = Helveticosid, (204) und (245). Präp. b (amorph) von LICHTI, enthielt nach Etikett 5 Stoffe: B, (Emicymarin, Spur), D, E, F. Die Kontrolle gab jetzt vier Flecke mit Laufstrecken (25), (60), 94 = Helveticosol und 158 = Helveticosid.

Präp. G I aus ADONIS VERNALIS gab zwei Flecke mit Laufstrecken von 40 und 114 mm. An diesen Stellen waren in den Chromatogrammen der Präparate aus S. LEDIENII keine Flecken vorhanden.

Es freut uns, die Befunde der Herren JUNIOR und WICHTL bestätigen zu können. Danach dürften die von LICHTI und Mitarb. in S. LEDIENII nachgewiesenen Stoffe D und E mit Helveticosid und Helveticosol identisch sein. Strophanthidin-D-digitalosid ist in S. LEDIENII nicht nachgewiesen und erstmals in ADONIS VERNALIS beobachtet worden".

5. Charakterisierung von Glykosid "grün III"

Die Überprüfung von Glykosid "grün I" durch Herrn Dr. von EUW im System Benzol-Tetrahydrofuran (1+1) hatte gezeigt, daß dieses Glykosid entgegen unseren Untersuchungen nicht einheitlich war, sondern im Papierchromatogramm zwei Flecken ergab. Auf eine papierchromatographische Isolierung der beiden Glykoside sollte jedoch verzichtet werden, da, wie schon die Auftrennung des Chloroform-Extraktes aus STROPHANTHUS HISPIDUS

im genannten System gezeigt hatte, eine restlose Entfernung des als stationäre Phase benutzten Formamids nur durch anschließende dünnschichtchromatographische Reinigung möglich ist.

Unseren Untersuchungen zufolge mußten beide Cardenolide das gleiche Aglykon, nämlich Strophanthidin besitzen. Von der Überlegung ausgehend, daß sich die beiden Glykoside durch verschiedene Substituenten am C-Atom 3 unterscheiden (obwohl mit Digitalose nur ein Zucker nachgewiesen werden konnte), schien eine Trennung im präparativen Maßstab am ehesten im auch zur Chromatographie von Zuckern verwendeten System VI Essigester-Isopropanol-Methanol (70+15+15) möglich.

Zur Überprüfung des Systems wurde in einem Vorversuch (s. Abb. 22) das bisher als Glykosid "grün I" bezeichnete Cardenolidgemisch zum Vergleich mit Glykosid "x" aus STROPHANTHUS HISPIDUS im System VI chromatographiert. Nach dem Besprühen der Platte mit KEDDE-Reagenz [22] waren im Gemisch zwei deutlich voneinander getrennte Flecken erkennbar, von denen der stärker gefärbte größere Laufstrecke aufwies, die mit der von Glykosid "x" aus STROPHANTHUS HISPIDUS identisch war. Alle drei Flecken ergaben mit Vanillin-Schwefelsäure einheitlich grüne Färbungen.

Die präparative Trennung von 12 mg Glykosidgemisch auf Kieselgel GF_{254}-Fertigplatten im System VI lieferte 5 mg Glykosid "grün I" mit gleichem R_f-Wert wie Glykosid "x" aus STROPHANTHUS HISPIDUS und 4 mg des im folgenden als Glykosid "grün III" bezeichneten Cardenolides.

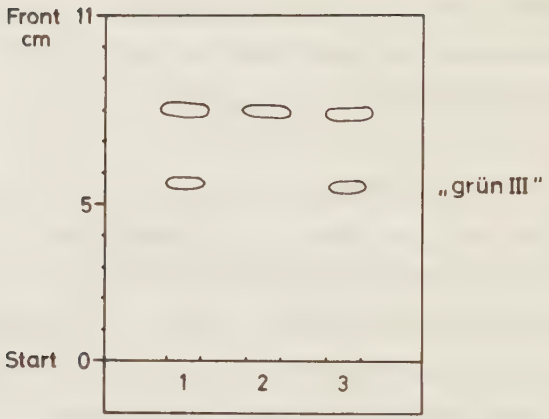


Abbildung 22 : Dünnschichtchromatographische Trennung der Glykoside "grün I" und "grün III" aus ADONIS VERNALIS
Schicht: Kieselgel GF_{254}-Fertigfolie
Fließmittel: Essigester-Isopropanol-Methanol (70+15+15) System VI
Anfärbung: KEDDE-Reagenz [22], Vanillin-H_2SO_4
1 und 3 = Gemisch der Glykoside "grün I" und "grün III"
2 = Glykosid "x" aus STROPHANTHUS HISPI

Zur Isolierung und Identifizierung der Zuckerkomponenten von Glykosid "grün I" und Glykosid "grün III" unterwarfen wir jeweils 1 mg Glykosid der sauren Hydrolyse (s. exp. Teil II.7., Seite 139) und untersuchten den Rückstand der wäßrigen Phasen zunächst dünnschichtchromatographisch im System VI. Als Vergleichssubstanzen wurden Digitalose und Thevetose (durch saure Hydrolyse aus Peruvosid zugänglich) mitchromatographiert, da für Strophothevosid ähnliches chromatographisches Verhalten beschrieben wird [30] wie für Glykosid "grün I"

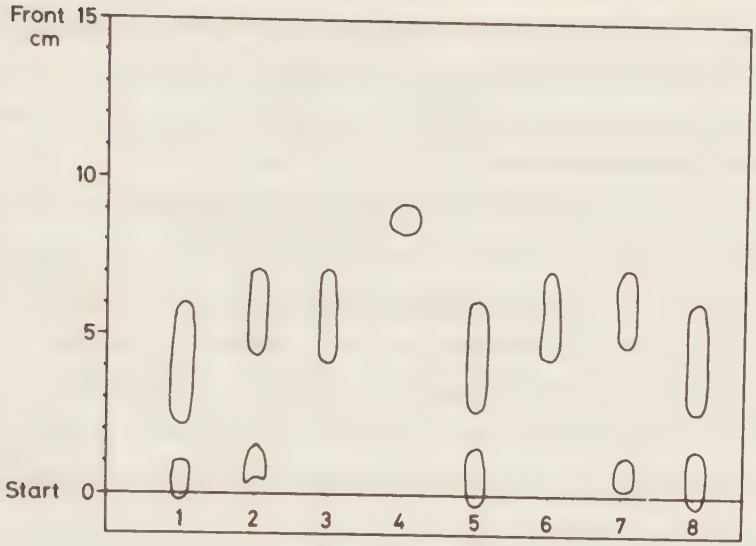


Abbildung 23 : Dünnschichtchromatographischer Vergleich der Zucker von Glykosid "grün I" und Glykosid "grün III"
Schicht: Kieselgel GF_{254}-Fertigplatte
Fließmittel: Essigester-Isopropanol-Methanol (70+15+15) System II
Anfärbung: 4-Aminohippursre.-Phthalsre.
1, 5 und 8 = Glucose und Rhamnose
2 und 7 = Glucose und Digitalose aus Glucoverodoxin
3 = Zucker aus Glykosid "grün I"
4 = Thevetose
6 = Zucker aus Glykosid "grün III"

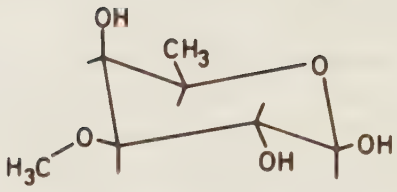
Nach dem Besprühen des Chromatogrammes (Abb. 23) mit 4-Aminohippursäure-Phthalsäure-Reagenz [27] waren alle Zucker bei Tageslicht als gelbe Flecken zu erkennen.

Digitalose und die Zucker der Glykoside "grün I" und "grün III" wiesen bei gestreckter Fleckform identische R_f-Werte auf. Thevetose ergab bei größerer Laufstrecke einen Fleck von rundlicher Form.

Die papierchromatographische Kontrolle des Ergebnisses erfolgte wieder im System IV Toluol-Butanol (1+2) bei einer Laufzeit von 55 Stunden (Durchlaufchromatogramm). Das mit 4-Aminohippursäure-Phthalsäure-Reagenz besprühte Chromatogramm (s. Abb. 24) bestätigte den Befund des dünnschichtchromatographischen Vergleiches. Auch hier ergaben sich für Digitalose und die Zucker der Glykoside "grün I" und "grün III" identische R_f-Werte.

Die Glykoside "grün I" und "grün III" aus ADONIS VERNALIS sowie Glykosid "x" aus STROPHANTHUS HISPIDUS sind Abkömmlinge des Strophanthidins, die D-Digitalose (s. Abb. 25) am C-Atom 3 des Steroidgrundkörpers glykosidisch gebunden enthalten. Glykosid "grün III" kann sich von den Glykosiden "grün I" und "x" durch die Verknüpfung zwischen Aglykon und Zuckerkomponente unterscheiden; darüberhinaus wäre das Vorliegen der Digitalose einerseits in der furanoiden, andererseits in der pyranoiden Form denkbar.

Abbildung 24 : Papierchromatographischer Vergleich der Zucker von Glykosid "grün I" und Glykosid "grün III"
Fließmittel: System IV
Anfärbung: 4-Aminohippursäure-Phthalsäure
1, 4 und 6 = Glucose und Rhamnose, 2 = Glucose und Digitalose aus Glucoverodoxin, 3 = Zucker aus Glykosid "grün I", 5 = Zucker aus Glykosid "grün III"



Digitalose

Abbildung 25 : Raumformel der D-Digitalose

Nach Reduktion der Glykoside mit Natriumboranat (s. exp. Teil II.8., Seite 140) und anschließender saurer Hydrolyse der Reduktionsprodukte (s. exp. Teil II.7., Seite 139) konnte aus dem Rückstand der organischen Phasen aller drei Glykoside Strophanthidol durch Cochromatographie mit authentischem Material nachgewiesen werden.

Eine Bestimmung der optischen Drehung konnte aufgrund der geringen Substanzmengen nicht durchgeführt werden. Die UV-Spektren (s. Abb. 26, 27 und 28) der Glykoside "grün I", "x" und "grün III" lassen das für Cardenolide typische Maximum bei 217 nm erkennen, die IR-Spektren (s. Abb. 29) sind praktisch identisch.

Die folgende Zusammenstellung gibt einen Überblick über die von uns ermittelten Daten der drei Glykoside:

	Glykosid "grün I"	Glykosid "x"	Glykosid "grün III"
Aglykon	Strophanthidin	Strophanthidin	Strophanthidin
Zucker	D-Digitalose	D-Digitalose	D-Digitalose
R_f-Werte			
S II	0,47	0,47	0,47
S VI	0,74	0,74	0,52
ärbung mit anillin-H_2SO_4	grün	grün	grün
chmelz-unkt	138 - 143 °C	145 - 150 °C	147 - 152 °C
V-Spektrum λmax	217 nm	217 nm	217 nm
	11570	11560	11280
log ε	4,06	4,06	4,05
D-Spektrum M+1	565	-	-

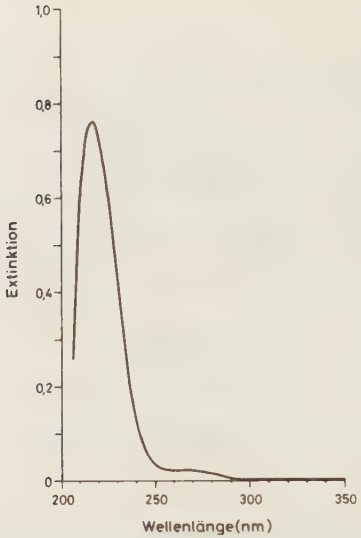


Abbildung 26 : UV-Absorptionsspektrum von Glykosid "grün I" aus ADONIS VERNALIS (in Methanol) (c = 0,93 mg / 25 ml)

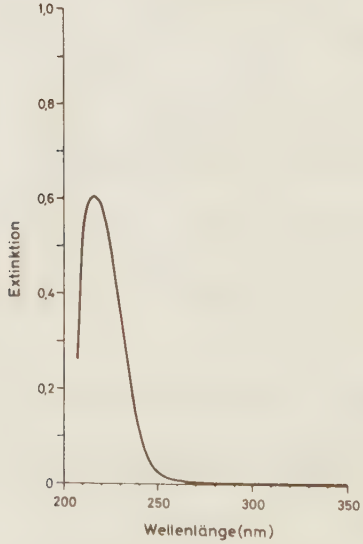
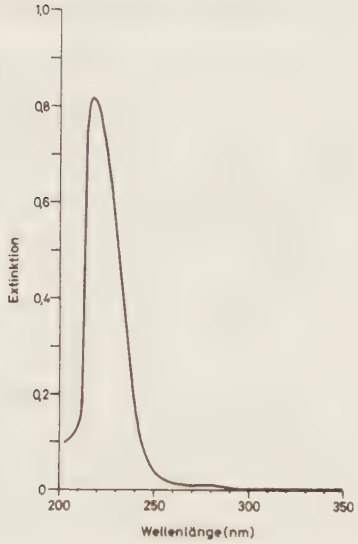
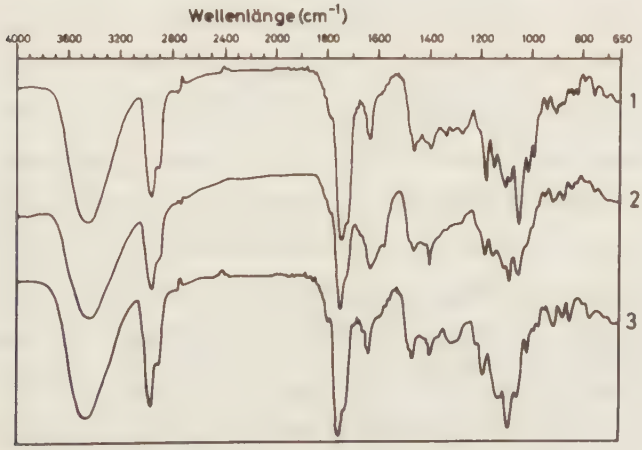


Abbildung 27 : UV-Absorptionsspektrum von Glykosid "grün III" aus ADONIS VERNALIS (in Methanol) (c = 0,75 mg / 25 ml)



bbildung 28 : UV-Absorptionsspektrum von Glykosid "x" aus STROPHANTHUS HISPIDUS (in Methanol, c = 1 mg/25 ml)



bbildung 29 : IR-Spektren von Glykosid "grün I" (1)
Glykosid "x" (2)
Glykosid "grün III" (3)

6. Identifizierung von Glykosid "grün II"

Glykosid "grün II" wies, wie bereits beschrieben (SC 3, Seite 38), nur geringfügig stärker polaren Charakter auf als das unmittelbar anschließend aus der Säule tretende Adonitoxin. Aufgrund seiner grünen Färbung mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz war zu erwarten, daß dieses Glykosid ebenso wie die Glykoside "grün I", "grün III" und "x" Strophanthidin als Aglykon enthielt.

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen hatten ergeben (s. C.1., Seite 46), daß ein Cardenolid mit ähnlichem chromatographischen Verhalten in Extrakten aus den Samen von STROPHANTHUS KOMBE und STROPHANTHUS HISPIDUS nicht aufzufinden war.

Ein weiterer Vergleich mit einem Gesamtglykosidextrakt aus dem Kraut von CONVALLARIA MAJALIS im System III ließ erkennen, daß zwei Cardenolide dieses Extraktes, die mit Vanillin-Schwefelsäure ebenfalls Grünfärbung zeigten, ähnliche Laufstrecken aufwiesen wie Glykosid "grün II". Hierbei handelte es sich nach dünnschichtchromatographischen Untersuchungen in den Systemen III und VI mit authentischen Substanzen um die Strophanthidinglykoside Convallatoxin und Desglucocheirotoxin. Glykosid "grün II" und Desglucocheirotoxin zeigten in beiden Systemen identische R_f-Werte, während Convallatoxin geringfügig niedrigere Laufstrecken ergab. Auch in zusätzlich durchgeführten Vergleichen in den Systemen Chloroform-Isopropanol (2+1) (IV) und Essigester-Pyridin-Wasser (5+1+4, Oberphase) (V) waren die Laufstrecken von Desglucocheirotoxin und Glykosid "grün II" identisch.

Der chromatographische Vergleich der Aglyka und der Zucker wurde mit den durch saure Hydrolyse (s. exp. Teil II.7., Seite 139) erhaltenen Spaltprodukten von 1 mg Glykosid "grün II" und ca. 0,5 mg Desglucocheirotoxin durchgeführt. Die Aglyka beider Glykoside waren nach Cochromatographie mit authentischem Material mit Strophanthidin identisch.

Der dünnschichtchromatographische Vergleich der Zucker erfolgte im System Essigester-Isopropanol-Methanol (70+15+15) (VI) auf selbstbeschichteten Kieselgel GF_{254}-Platten, die mit einer 0,02 molaren Natriumacetatlösung imprägniert waren. Auf den mit 4-Aminohippursäure-Phthalsäure-Reagenz besprühten Chromatogrammen waren die Zucker als stark gelb gefärbte Flecken zu erkennen (s. Abb. 30).

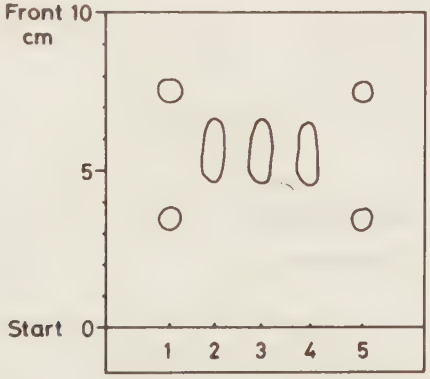
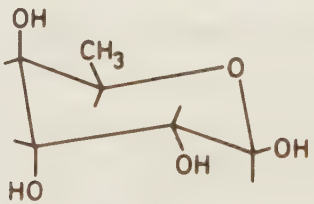


Abbildung 30 : Dünnschichtchromatographischer Vergleich des Zuckers aus Glykosid "grün II" mit Gulomethylose
Schicht: selbstbeschichtete Kieselgel GF_{254}-Platte, mit 0,02 mol. Natriumacetatlösung imprägniert
Fließmittel: Essigester-Isopropanol-Methanol (70+15+15) System VI
Anfärbung: 4-Aminohippursre.-Phthalsre.
1 und 5 = Glucose und Rhamnose, 2 und 4 = Gulomethylose aus Desglucocheirotoxin,

Der Zucker von Glykosid "grün II" zeigt eine geringere Laufstrecke als die mitchromatographierte Rhamnose; die R_f-Werte von Gulomethylose aus Desglucocheirotoxin und dem Zucker des von uns isolierten Cardenolides waren identisch.

Die papierchromatographische Überprüfung im System Toluol-Butanol (1+2) (IV) bei einer Laufzeit von 55 Stunden (Durchlaufchromatogramm) erbrachte für 6-Desoxygulose aus Desglucocheirotoxin und den Zucker aus Glykosid "grün II" gleiche Laufstrecken; Rhamnose erwies sich als geringfügig polarer (s. Abb. 30). Demnach ist der Zucker aus Glykosid "grün II" mit Gulomethylose (Abb. 31) identisch, Glykosid "grün II" aus ADONIS VERNALIS entspricht Desglucocheirotoxin.



Gulomethylose
(Antiarose)

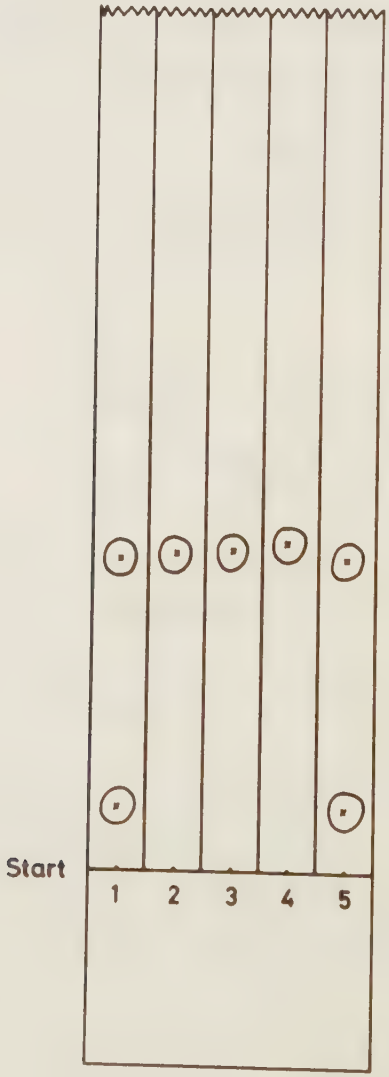
Abbildung 31 : Raumformel der Gulomethylose

Der Schmelzpunkt für Glykosid "grün II" lag bei 192 - 197 °C (authentisches Desglucocheirotoxin: 192 - 196 °C), der Mischschmelzpunkt ergab keine Depression. Das UV-Spektrum (Abb. 33) zeigt das für Cardenolide typische Maximum bei 217 nm

(log ε = 4,19), die in Abb. 34 wiedergegebenen IR-Spektren beider Glykoside (mit Bleireduzierringen in Kaliumbromid verpreßt) sind identisch.

Durch Reduktion mit Natriumboranat und anschließende saure Hydrolyse des entstandenen Produktes (s. exp. Teil II.7. und 8., Seite 139) erhielten wir ein Aglykon, das im dünnschichtchromatographischen Vergleich mit authentischem Material als Strophanthidol identifiziert werden konnte.

Abbildung 32 : Papierchromatographischer Vergleich des Zuckers aus Glykosid "grün II" mit Gulomethylose
Fließmittel: System IV, Durchlaufchromatogramm 55 Stunden
Anfärbung: 4-Aminohippursre.-Phthalsre.
1 und 5 = Glucose und Rhamnose, 2 und 4 = Zucker aus Glykosid "grün II", 3 = Gulomethylose



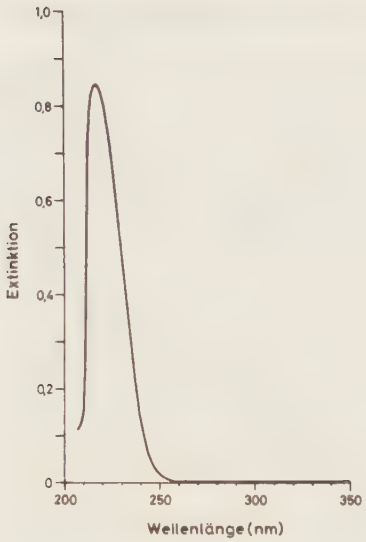


Abbildung 33 : UV-Absorptionsspektrum von Glykosid "grün II" aus ADONIS VERNALIS (in Methanol, c = 0,75 mg / 25 ml)

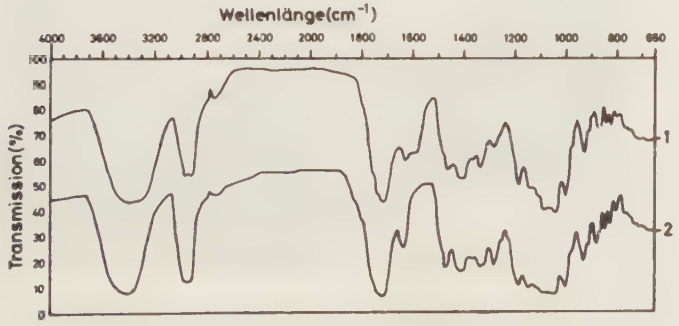


Abbildung 34 : IR-Spektren von Glykosid "grün II" (1)
Desglucocheirotoxin (2)

7. Charakterisierung von Glykosid "blau"

Das als Glykosid "blau" bezeichnete Cardenolid wies bei dünnschichtchromatographischen Untersuchungen in den Systemen I und II polareren Charakter als Strophanthidin auf und konnte als Monoglykosid angesprochen werden. Aufgrund seiner Farbreaktion mit Vanillin-Schwefelsäure (graublau mit violettem Hof) unterschied es sich von den bisher aus ADONIS VERNALIS isolierten Glykosiden und Aglyka und war darüberhinaus auch in keinem der zu chromatographischen Vergleichen herangezogenen Extrakte anderer herzglykosidhaltiger Pflanzen nachzuweisen.

Nach saurer Hydrolyse von 1 mg Glykosid "blau" (s. exp. Teil II.7., Seite 139) war aus dem Rückstand der organischen Phase ein einheitliches Produkt nachweisbar, das im dünnschichtchromatographischen Vergleich in den Systemen I und III größere Laufstrecken aufwies als die Ausgangssubstanz. Das Hydrolyseprodukt ergab positive KEDDE-Reaktion [22] und färbte sich mit Vanillin-Schwefelsäure graublau (mit violettem Hof) wie Glykosid "blau". Aus dem Rückstand der wäßrigen Phase konnte jedoch kein Zucker nachgewiesen werden.

Auch nach einer energischen Hydrolyse von 1 mg Glykosid nach KILIANI [31] konnte durch chromatographische Verfahren der Nachweis eines Zuckers nicht erbracht werden.

Glykosid "blau" erwies sich bei dünnschichtchromatographischen Vergleichen als nicht identisch mit Periplogenin, Sarmentogenin und Sarverogenin [+], die mit Vanillin-Schwefel-

---

+) Ich danke auch an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. T. REICHSTEI für die freundliche Überlassung der Vergleichssubstanzen.

säure unterschiedliche Blaufärbungen ergeben. Alle vier untersuchten Cardenolide zeigten jedoch nach Besprühen der Chromatogramme mit JENSENS-Reagenz [32] (Mischung von 15 Vol.-Tl. einer 25proz. Lösung von Trichloressigsäure in Äthanol mit 1 Vol.-Tl. einer 3proz. Lösung von Chloramin T in Wasser) und anschließendem Erhitzen auf 120 °C gleiche intensiv gelbe Fluoreszenz im UV-Licht von 366 nm.

Der Schmelzpunkt des in langen Nadelbüscheln kristallisierenden Cardenolides (Abb. 35) lag bei 211 - 214 °C, das UV-Spektrum (Abb. 36) wies das für Cardenolide typische Maximum bei 217 nm und eine Schulter zwischen 260 und 270 nm mit einem Maximum bei 262 nm auf.

Abbildung 35 : Kristallbüschel von Glykosid "blau"
Vergrößerung ca. 80fach

Das IR-Spektrum (Abb. 37) zeigt neben den Absorptionsbanden des Butenolidringes bei 1755 cm^{-1} und 1620 cm^{-1} eine zusätzliche ausgeprägte Bande bei 1725 cm^{-1}, die in Anlehnung an die Strukturermittlung des Sarverogenins durch FUHRER, ZÜRCHER und REICHSTEIN [33] einer zusätzlichen Carbonylgruppe am Steroidgrundkörper zugeordnet werden kann.

Im FD-Massenspektrum wurden Massenzahlen zwischen 387 und 390 erhalten, was, ebenso wie die Tatsache, daß keine Zuckerkomponente nachgewiesen werden konnte, für das Vorliegen eines Aglykons spricht. Die Bezeichnung Glykosid wäre also aufzugeben und besser durch Substanz "blau" zu ersetzen.

Weitere Aussagen sind über die Identität des als Glykosid "blau" bezeichneten Cardenolides infolge der geringen Substanzmengen nicht möglich.

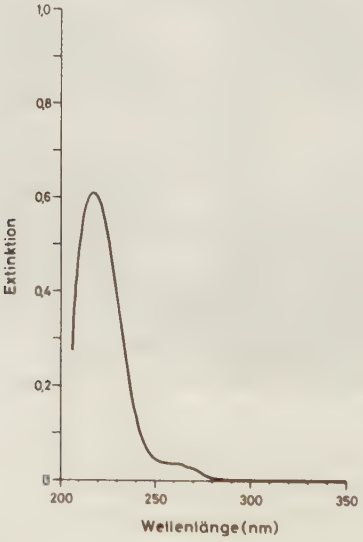


Abbildung 36 : UV-Absorptionsspektrum von Glykosid "blau" aus
ADONIS VERNALIS (in Methanol, c = 1,06 mg/ 50 m

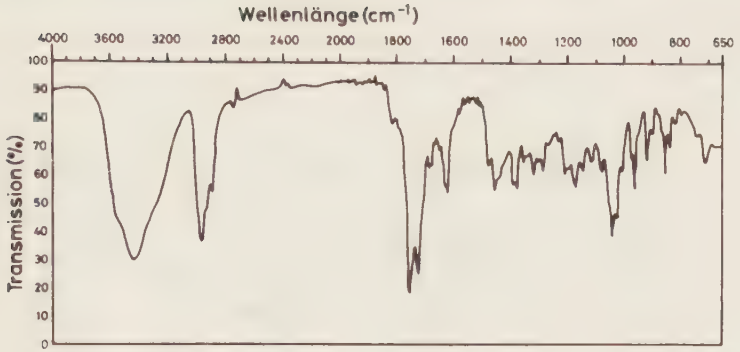
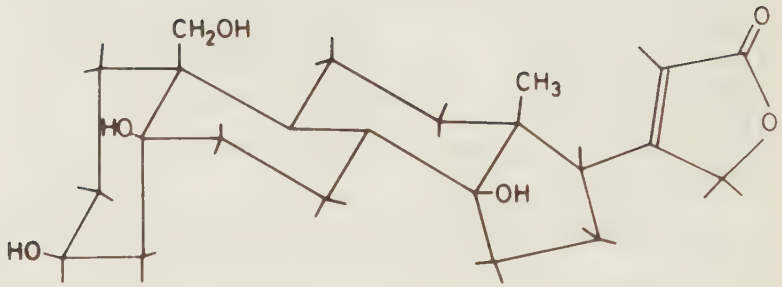


Abbildung 37 : IR-Spektrum von Glykosid "blau"

8. Identifizierung von Glykosid "grau I"

Die Glykoside "grau I" und "grau II" waren in der gleichen Sammelfraktion von SC 6 im Verhältnis von etwa 3:2 enthalten. Bei dünnschichtchromatographischen Untersuchungen im System I zeigte Glykosid "grau I" größere, Glykosid "grau II" hingegen geringere Laufstrecke als Strophanthidin. Die graue Färbung mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz ließ vermuten, daß es sich bei beiden Glykosiden um Strophanthidolabkömmlinge handeln könne.

Glykosid "grau I" ergab positive Xanthydrolreaktion und enthielt demnach einen 2-Desoxy- bzw. 2,6-Didesoxy-Zucker im Molekül. Aus dem Rückstand der organischen Phase konnte nach saurer Hydrolyse (s. exp. Teil II.7., Seite 139) durch Cochromatographie mit authentischem Material Strophanthidol nachgewiesen werden. Abb. 38 zeigt die Raumformel des Strophanthidols.



Strophanthidol

Abbildung 38 : Raumformel des Aglykons Strophanthidol

Zur Identifizierung der Zuckerkomponente nahmen wir einen dünnschichtchromatographischen Vergleich mit den 3-O-Methyl-2,6-didesoxyhexosen Cymarose, Sarmentose und Oleandrose sowie der 2,6-Didesoxyhexose Digitoxose im System VI vor (die Zucker waren aus den Glykosiden Cymarin, Sarmentocymarin, Oleandrin und Helveticosid durch saure Hydrolyse zugänglich). Alle Zukker waren nach dem Besprühen des Chromatogramms mit 4-Aminohippursäure-Phthalsäure-Reagenz als gelbe Flecken sichtbar, die 2-Desoxyzucker ergaben nach zusätzlichem Besprühen mit Xanthydrol-Reagenz einheitlich rotviolette Färbung. Cymarose und der Zucker aus Glykosid "grau I" ergaben identische R_f-Werte, während Oleandrose und Sarmentose deutlich unter-

schiedliche Laufstrecken aufwiesen. Die ebenfalls mitchromatographierte Digitoxose erwies sich erwartungsgemäß als polarster Zucker (s. Abb. 39).

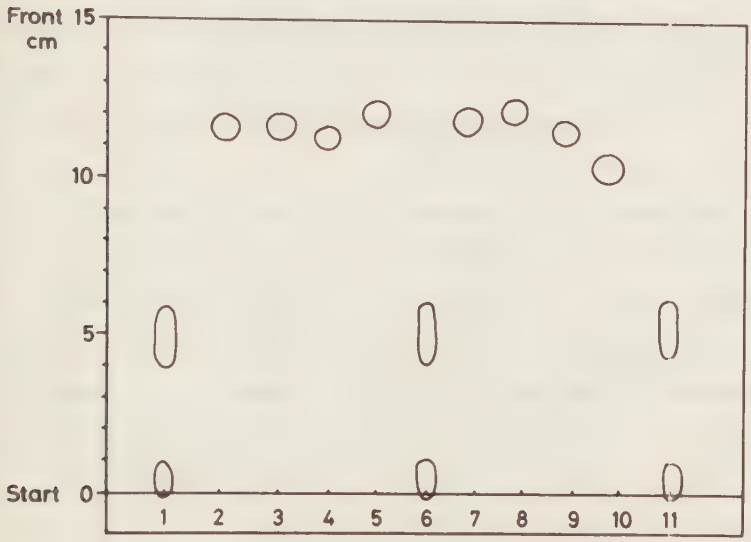
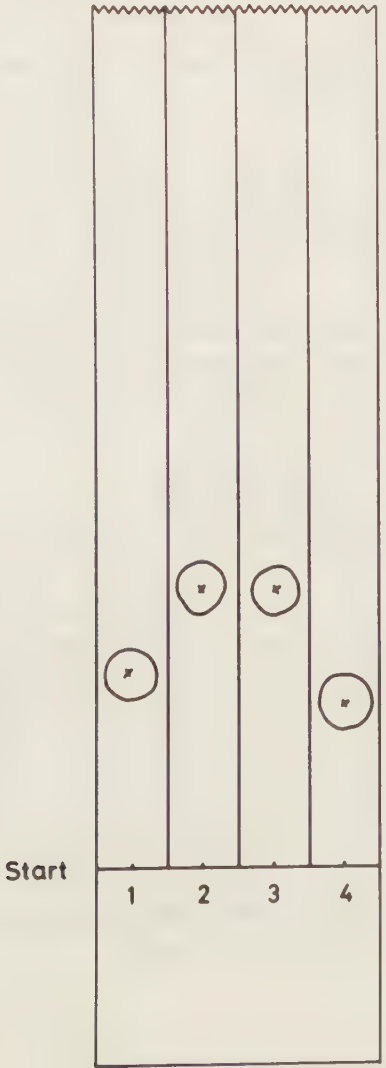


Abbildung 39 : Dünnschichtchromatographischer Vergleich der 3-O-Methyl-2,6-didesoxyhexosen Cymarose, Sarmentose und Oleandrose mit dem Zucker aus Glykosid "grau I"
Schicht: Kieselgel GF_{254}-Fertigplatte
Fließmittel: Essigester-Isopropanol-Methanol (70+15+15) System VI
Anfärbung: 4-Aminohippursre.-Phthalsre., Xanthydrolreagenz
1, 6 und 11 = Glucose und Rhamnose, 2 = Cymarose, 3 und 7 = Zucker von Glykosid "grau I" aus ADONIS VERNALIS, 4 und 9 = Sarmentose, 5 und 8 = Oleandrose, 10 = Digitoxose

Die papierchromatographische Kontrolle unseres Befundes im System Toluol-Methyläthylketon-Wasser (1+1+2) (V) bei einer Laufzeit von 24 Stunden (Durchlaufchromatogramm) ist in Abb. 40 wiedergegeben. Nach dem Besprühen des Chromatogrammes mit Xanthydrolreagenz zeigten Cymarose und der Zucker aus Glykosid "grau I" identische Laufstrecken, während Oleandrose und Sarmentose polareres Verhalten aufwiesen. Glykosid "grau I" ist demnach mit Cymarol identisch.

Der Schmelzpunkt des in groben, farblosen Kristallen erhaltenen Glykosides war unscharf und lag bei 215 - 240 °C. Das UV-Spektrum (Abb. 41) zeigte das für Cardenolide charakteristische Maximum bei 217 nm (log ε = 4,12); die in Abb. 42 wiedergegebenen IR-Spektren von Glykosid "grau I" und authentischem Cymarol sind identisch. Das FD-Massenspektrum von Glykosid "grau I" ergab eine Massenzahl von 551 (M+1), was der Molmasse von Cymarol entspricht.

Abbildung 40 : Papierchromatographischer Vergleich der 3-O-Methyl-2,6-didesoxyhexosen Cymarose, Sarmentose und Oleandrose mit dem Zucker von Glykosid "grau I"
Fließmittel: System V, Durchlaufchromatogramm 24 Stunden
Anfärbung: Xanthydrolreagenz
1 = Oleandrose, 2 = Cymarose, 3 = Zucker aus Glykosid "grau I", 4 = Sarmentose



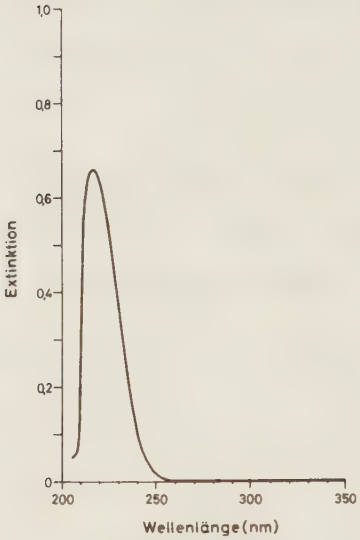


Abbildung 41 : UV-Absorptionsspektrum von Glykosid "grau I" aus ADONIS VERNALIS (in Methanol, c = 0,7 mg / 25 ml)

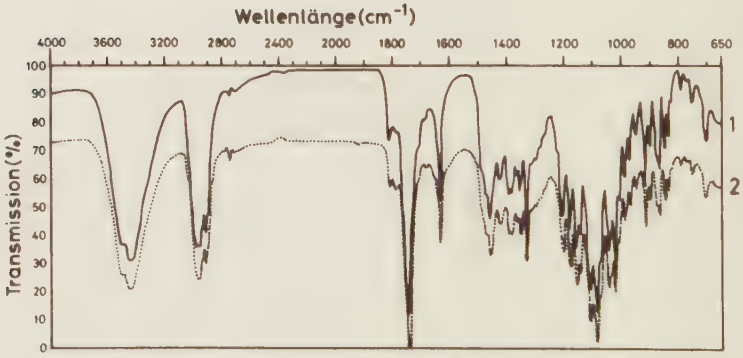


Abbildung 42 : IR-Spektren von Glykosid "grau I" (1)
Cymarol (2)

9. Charakterisierung von Glykosid "grau II"

Glykosid "grau II" schien zunächst aufgrund sehr ähnlicher Laufstrecke bei einem dünnschichtchromatographischen Vergleich in System I mit Strophanthidol identisch zu sein. Da jedoch diesbezüglich eine eindeutige Aussage nicht zu treffen war, wurde 1 mg des Cardenolides der sauren Hydrolyse unterworfen (s. exp. Teil II.7., Seite 139).

Bei der dünnschichtchromatographischen Überprüfung des Rückstandes der wäßrigen Phase im System VI war nach dem Besprühen des Chromatogrammes mit 4-Aminohippursäure-Phthalsäure-Reagenz im Bereich der schwach polaren 2-Desoxyzucker ein gelb gefärbter, kreisrunder Fleck zu erkennen, der eine positive Xanthydrolreaktion ergab. Der Vergleich des Zuckers mit Digitoxose und Cymarose in einem weiteren Chromatogramm ergab eine Übereinstimmung der Laufstrecken der Cymarose und des Zuckers aus Glykosid "grau II" (s. Abb. 43).

Die Kontrolle dieses Befundes durch einen papierchromatographischen Vergleich (s. Abb. 44) erfolgte im System Toluol-Methyläthylketon-Wasser (1+1+2) (V) bei einer Laufzeit von 24 Stunden (Durchlaufchromatogramm). Nach dem Besprühen des Chromatogrammes mit Xanthydrolreagenz zeigte sich, daß die Laufstrecken der auf den beiden Außenbahnen mitchromatographierten Cymarose und der Zucker der Glykoside "grau I" und "grau II" (auf den Bahnen 2 und 3) identisch waren.

Aus dem Rückstand der organischen Phase konnte durch Cochromatographie mit authentischem Material Strophanthidol als Aglykon nachgewiesen werden. Eine Unterscheidung von

Glykosid "grau II" war im System I nur unter Verwendung der Xanthydrolreaktion möglich. Die Abb. 45 zeigt den dünnschichtchromatographischen Vergleich der Sammelfraktion, in der die Glykoside "grau I" und "grau II" neben Cymarin enthalten waren, mit den gereinigten Glykosiden sowie deren Spaltprodukten und dem Spaltprodukt aus authentischem Cymarol.

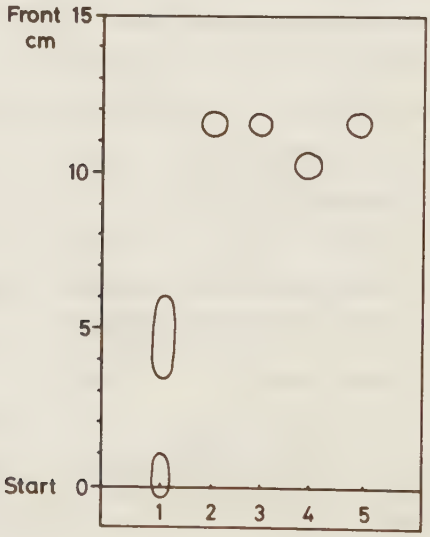
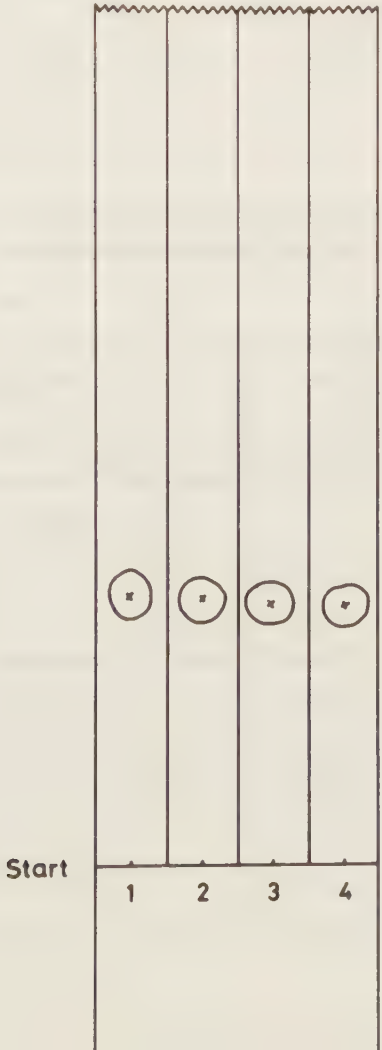


Abbildung 43 : Dünnschichtchromatographischer Vergleich des Zuckers aus Glykosid "grau II" mit Cymarose und Digitoxose
Schicht: Kieselgel GF_{254}-Fertigplatte
Fließmittel: Essigester-Isopropanol-Methanol (70+15+15) System VI
Anfärbung: 4-Aminohippursre.-Phthalsre. Xanthydrol-Reagenz
1 = Glucose und Rhamnose, 2 = Cymarose
3 und 5 = Zucker aus Glykosid "grau II"
4 = Digitoxose

Abbildung 44 : Papierchromatographischer Vergleich der Zucker aus Glykosid "grau I" und Glykosid "grau II" mit authentischer Cymarose aus Cymarin
Fließmittel: System V, Durchlaufchromatogramm 24 Stunden
Anfärbung: Xanthydrol-Reagenz
1 und 4 = Cymarose aus Cymarin
2 = Zucker aus Glykosid "grau I"
3 = Zucker aus Glykosid "grau II"



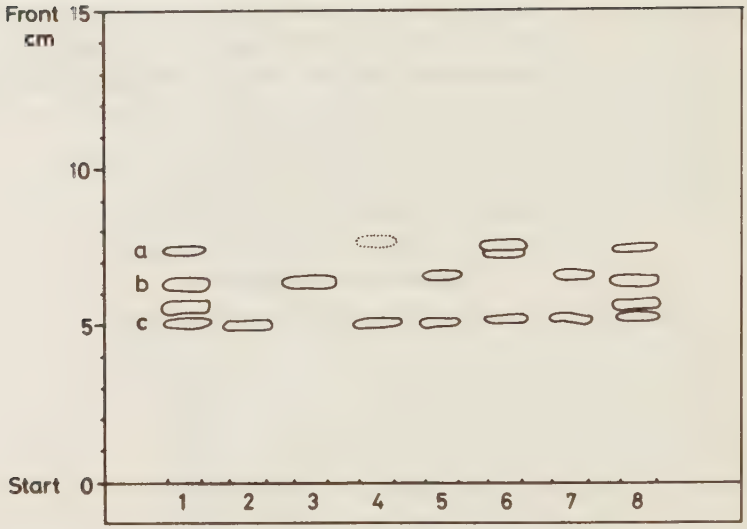


Abbildung 45 : Dünnschichtchromatographischer Vergleich der Glykoside "grau I" und "grau II" mit Strophanthidol

Schicht: Kieselgel GF_{254}-Platte

Fließmittel: Chloroform-Methanol-Wasser (85+14+1) System I

Anfärbung: KEDDE-Reagenz [22]; Vanillin-H_2SO_4

1 und 8 = Sammelfraktion SF 1 von SC 6

2 = Glykosid "grau II", 3 = Glykosid "grau I"

4 = Glykosid "grau II" gespalten

6 = Glykosid "grau I" gespalten

5 und 7 = Cymarol gespalten

a = Cymarin, b = Glykosid "grau I" (= Cymarol),

c = Glykosid "grau II"

Hieraus ist ersichtlich, daß die Flecken von Strophanthidol und Glykosid "grau II" nahezu identische R_f-Werte aufweisen. Das Chromatogramm läßt darüberhinaus erkennen, daß selbst bei den von uns gewählten milden Hydrolysebedingungen Anhydroprodukte nicht völlig auszuschließen waren. Bei dem vierten in der Sammelfraktion nicht bezeichneten Fleck handelte es sich nicht um ein Cardenolid.

Demnach ist Glykosid "grau II" ebenso wie Glykosid "grau I" als Strophanthidolcymarosid anzusprechen.

In weiteren Untersuchungen sollte geklärt werden, ob das polarere Verhalten von Glykosid "grau II" eventuell auf das Vorhandensein von zwei Cymarose-Molekülen im Glykosid, ähnlich z.B. dem Digitoxigeninbisdigitoxosid aus DIGITALIS-Species, zurückgeführt werden könne.

Hierzu wurden jeweils 1 mg Glykosid und authentisches Cymarol, abweichend von den üblichen Bedingungen, 5 Stunden bei 80 °C hydrolysiert, worauf aus dem Rückstand der organischen Phasen nur noch Anhydroprodukte dünnschichtchromatographisch nachweisbar waren.

Die Rückstände der wäßrigen Phasen wurden in jeweils 0,2 ml Methanol-Wasser (1+1) aufgenommen; jeweils 2 µl der erhaltenen Lösungen trugen wir alternierend auf die Startlinie einer Kieselgel GF_{254}-Fertigplatte auf (8 Auftragungen im Abstand von 2,3 cm untereinander). Nach der Entwicklung im System VI über 15 cm Trennstrecke wurde das Chromatogramm mit Xanthydrolreagenz bis zur einheitlichen Feuchte besprüht und darauf zur optimalen Farbtiefe bei 120 °C erhitzt. Die Auswertung des Chromatogrammes erfolgte durch Aufnahme der Remissions-

ortskurven mit dem SCHÖFFEL SD 3000 Densitometer bei einer Wellenlänge von 540 nm (Densitometerdaten sonst wie im exp. Teil IV.3. für Scillaren A und Proscillaridin A beschrieben).

Der Vergleich der Peakhöhen der Remissionsortskurven ergab, daß die Konzentration der Zuckerlösung aus Glykosid "grau II" an Cymarose geringer war als die des authentischen Cymarols. Dieses ist, wie das UV-Spektrum (s. Abb. 46) von Glykosid "grau II" zeigt, auf das Vorhandensein von Verunreinigungen zurückzuführen.

Der quantitative Vergleich der Zuckerkomponenten läßt jedoch den Schluß zu, daß es sich bei Glykosid "grau II" nur um ein Monoglykosid handeln kann. Die Bestätigung dieser Annahme konnte durch die Aufnahme eines FD-Massenspektrums erhalten werden. Für Glykosid "grau II" ergab sich, ebenso wie für Glykosid "grau I", eine Massenzahl (M+1) von 551. Ein weiterer Peak der Masse (M+1) von 407 konnte dem Aglykon Strophanthidol zugeordnet werden.

Bei dem Versuch, eine weitere Reinigung vorzunehmen, zerfiel das Glykosid teilweise in Aglykon und Zuckerkomponente, so daß auf die Aufnahme eines IR-Spektrums verzichtet werden mußte.

Auch hier, wie schon bei der Charakterisierung der Glykoside "grün I" und "grün III", erscheint es denkbar, daß sich die Glykoside "grau I" und "grau II" einerseits durch die Verknüpfung zwischen Aglykon und Zuckerkomponente, andererseits durch das Vorliegen des Zuckers in der pyranoiden bzw. furanoiden Form unterscheiden.

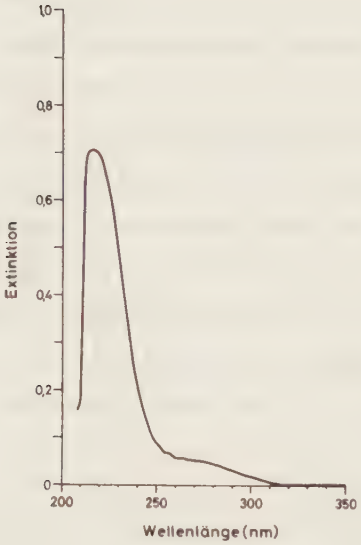


Abbildung 46 : UV-Spektrum von Glykosid "grau II" aus ADONIS VERNALIS (in Methanol)

E. Untersuchungen zur Analytik herzglykosidhaltiger Drogen bezüglich einer Standardisierung sowie der Qualitätskontrolle von Extrakten und Kombinationspräparaten

1. Säulenchromatographische Untersuchungen an Aluminiumoxid zur Bestimmung der irreversiblen Adsorption von Cardenoliden

Zur Charakterisierung herzglykosidhaltiger Drogen und daraus hergestellter Extrakte ist es erforderlich, neben einer Gesamtglykosidgehaltsbestimmung, die zudem nur bei cardenolidhaltigen Drogen durchführbar ist (Bufadienolide sind

aufgrund ihres Cumalinringes der BALJET-Reaktion [20] nicht zugänglich) eine quantitative Bestimmung möglichst vieler einzelner Komponenten vorzunehmen. Dies geschieht in aller Regel nach papier- oder dünnschichtchromatographischer Trennung des Glykosidkomplexes in einzelne Glykosidzonen mit Hilfe photometrischer Methoden. Dazu werden zunächst die Substanzen aus den entsprechenden Zonen mit geeigneten Lösungsmitteln eluiert; die Gehaltsbestimmung erfolgt dann in den meisten Fällen unter Verwendung der BALJET-Reaktion [20] auf photometrischem Wege. Da die der Messung zugrunde liegende Reaktion keineswegs für Cardenolide spezifisch ist, muß eine weitgehende Reinigung der zur Chromatographie eingesetzten Extrakte angestrebt werden. Ähnlichen Problemen sieht sich die densitometrische Direktauswertung von Chromatogrammen gegenüber, da zu große Mengen an Ballaststoffen eine selektive Erfassung und damit eine Bestimmung einzelner Substanzen in einer dem Aufwand angemessenen Fehlergrenze überaus erschweren.

Da sich zur Abtrennung von Ballaststoffen die Säulenchromatographie an Aluminiumoxidsäulen (SC 3 - SC 4) bewährt hatte, sollte zunächst in ersten orientierenden Untersuchungen das Ausmaß der Adsorption von Cardenoliden an Aluminiumoxid bestimmt werden.

a) Gesamtextrakt aus ADONIS VERNALIS

Zur Chromatographie diente ein Chloroform-Isopropanol (3+2)-Extrakt mit einem Gesamtglykosidgehalt von 40,1 mg Glykosiden, berechnet als Adonitoxin (s. exp. Teil I.1., Seite 122). Als

Säulenfüllung dienten 50 g Aluminiumoxid der Aktivitätsstufe II (entspr. 3 % Wassergehalt).Die Elution erfolgte mit Chloroform und steigendem Methanolanteil in der mobilen Phase sowie mit reinem Methanol. Die Ablösung der stark polaren Glykoside nahmen wir mit Methanol-Wasser (90+10) vor. Bei der dünnschichtchromatographischen Kontrolle waren nach der Elution mit insgesamt 4,6 l mobiler Phase keine Cardenolide mehr nachweisbar.

Die Bestimmung des Gesamtglykosidgehaltes aus dem Rückstand der organischen Phasen ergab einen Wert von 39,55 mg, das entspricht 98,6 % der eingesetzten Gesamtglykoside.

b) Extrakt des Kombinationspräparates MIROTON ®

Die Berechnung des Gesamtglykosidgehaltes des Chloroform-Isopropanol (3+2)-Extraktes erfolgte ebenfalls als Adonitoxin, ungeachtet der Tatsache, daß die Cardenolide aus CONVALLARIA MAJALIS und NERIUM OLEANDER bei der BALJET-Reaktion [20] unterschiedliche Extinktionskoeffizienten aufweisen und Bufadienolide aus URGINEA MARITIMA dieser Art der Bestimmung nicht zugänglich sind. Eingesetzt wurden 116 mg Gesamtglykoside, die an 120 g Aluminiumoxid der Aktivitätsstufe II analog a) chromatographiert wurden. Bei der dünnschichtchromatographischen Kontrolle waren nach Elution mit insgesamt 16,1 l mobiler Phase keine Cardenolide mehr nachzuweisen.

Die Gesamtglykosidgehaltsbestimmung erbrachte einen Wert von 96,8 mg, das entspricht 83,5 % der eingesetzten Glykoside.

Da einerseits die Wiederfindungsrate der eingesetzten Glykosidmengen nach diesen Vorversuchen nicht reproduzierbar erscheint, andererseits der hohe Zeitaufwand der säulenchromatographischen Trennung nicht gerechtfertigt erscheint, wurde auf den Einsatz der Säulenchromatographie zu quantitativen Bestimmungen generell verzichtet.

2. Quantitative Dünnschichtchromatographie

Ziel unserer Untersuchungen war es, Methoden zur quantitativen Bestimmung der Hauptglykoside aus ADONIS VERNALIS, NERIUM OLEANDER und URGINEA MARITIMA durch densitometrische Direktauswertung nach dünnschichtchromatographischer Trennung aus den Gesamtextrakten zu erarbeiten. Da nur wenige Glykoside von entsprechendem Reinheitsgrad erhältlich sind, um zur Erstellung von Eichfunktionen herangezogen werden zu können, war die Anzahl der bestimmbaren Komponenten aus den Glykosidextrakten von vornherein begrenzt. Wir beschränkten uns daher zunächst darauf, eine quantitative Bestimmung der Hauptinhaltsstoffe Adonitoxin, Oleandrin sowie Scillaren A und Proscillaridin A vorzunehmen. Adonitoxin soll in ADONIS VERNALIS mit bis zu 20 % am Gesamtglykosidgehalt beteiligt sein [16], während Scillaren A und Proscillaridin A zusammen über 50 % des Gesamtglykosidgehaltes von Bulbus SCILLAE ausmachen. Für Oleandrin werden dagegen je nach Aufarbeitungsart der Droge unterschiedliche Angaben gemacht.

a) In situ-Fluoreszenzmessung von Adonitoxin aus ADONIS VERNALIS

Versuche, eine densitometrische Bestimmung der ADONIS-Glykoside nach der Auftrennung in verschiedenen Fließmittelsystemen unter Ausnutzung ihres charakteristischen Maximums bei 217 nm vorzunehmen, scheiterten daran, daß sich in diesem Wellenlängenbereich die nicht abtrennbaren Ballaststoffe besonders störend auswirkten. Da jedoch einige Cardenolide, unter ihnen auch Adonitoxin, beim Bedampfen der Chromatogramme mit Salzsäure intensiv blaue Fluoreszenzen ergaben, erschien es zweckmäßig, die quantitative Bestimmung des Adonitoxins unter Ausnutzung dieser Reaktion durchzuführen.

Strophanthidinglykoside wie Cymarin und k-Strophanthin-ß ergeben unter den gewählten Bedingungen (s. exp. Teil IV.3., Seite 154) keine Fluoreszenz, sind daher mit dieser Methode nicht zu bestimmen. Andererseits enthält der Gesamtglykosidextrakt Substanzen, die Fluoreszenz aufweisen, bei denen es sich jedoch nicht um Cardenolide handelt. Es erfolgte daher eine Optimierung der Trennung unter dem Aspekt, Adonitoxin von Begleitsubstanzen möglichst weitgehend zu isolieren.

Eine zufriedenstellende Trennung konnte im System Chloroform-Methyläthylketon-Diäthylamin-Wasser (10+65+20+5) erzielt werden, wobei die stark polaren Substanzen im unteren, die schwächer polaren und Aglyka im oberen Drittel der Platte ungetrennt zusammengedrängt erscheinen (s. Abb. 46). Die Flekken oberhalb des Adonitoxins sind bereits so diffus, daß eine densitometrische Erfassung nicht mehr möglich ist.

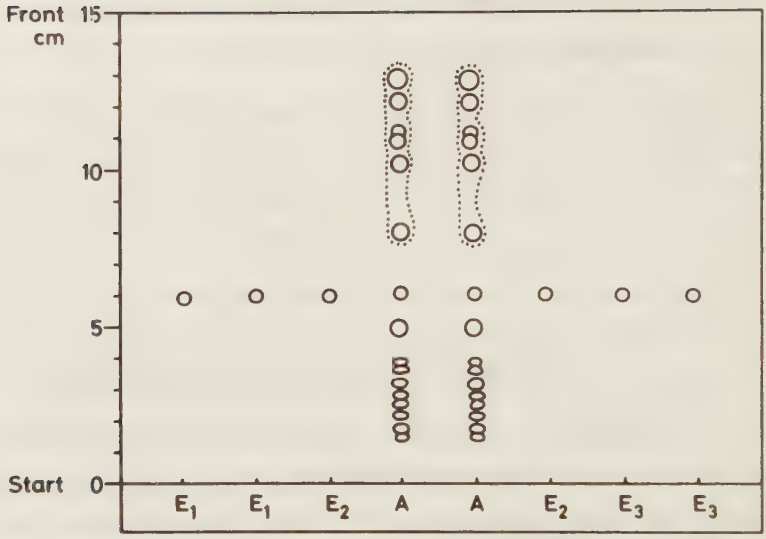


Abbildung 46 : Quantitative Bestimmung von Adonitoxin aus ADONIS-Extrakt
Schicht: Kieselgel GF_{254}-Fertigplatte
Fließmittel: Chloroform-Methyläthylketon-Diäthylamin-Wasser (10+65+20+5)
Detektion: HCl-Dampf, alle Flecken fluoreszieren im UV-Licht bei 366 nm blau, die in der punktierten Zone befindlichen Flecken erscheinen diffus
A = Analyse, E_1, E_2 und E_3 = Eichlösungen unterschiedlicher Konzentration (s. exp. Teil IV.1.a, Seite 150)

Die Abb. 47 gibt die Fluoreszenzortskurve eines Chromatogrammes vom Start bis zum ersten Fleck oberhalb des Adonitoxins wieder, der nur noch einen schwach ausgeprägten, flachen Peak aufweist.

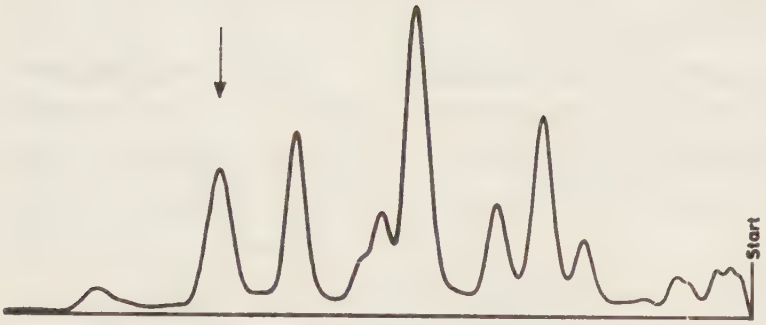


Abbildung 47 : Fluoreszenzortskurve des ADONIS-Extraktes der Pfeil markiert den Peak des Adonitoxins

Die Auswertung der Fluoreszenzortskurven erfolgte über die Peakhöhen, da sich diese Methode in dem von uns gewählten Konzentrationsbereich der Auswertung über die Peakflächen bzw. die Quadrate der Peakflächen als überlegen erwiesen hatte. Auf jeder Platte wurde über drei Eichkonzentrationen eine neue Eichgerade erstellt (Konzentrationen, chromatographische Parameter und Densitometerdaten s. exp. Teil F.IV. 1-4.).

Bei der Auswertung von 5 Platten ergaben sich für Adonitoxin aus einem Chloroform-Isopropanol (3+2)-Extrakt eines ADONIS-Konzentrates mit einem Gesamtglykosidgehalt von 0,485 g / 100 ml die in Tabelle 1 aufgeführten Werte.

Tabelle 1

Platte	ug Adonitoxin	g/100 ml Konzentrat
1	0,285	0,034
	0,29	0,035
2	0,275	0,033
	0,285	0,034
3	0,30	0,036
	0,29	0,035
4	0,285	0,034
	0,29	0,035
5	0,30	0,036
	0,30	0,036

Mittelwert $\bar{x}$: 0,29 relative Standardabweichung s_{rel}: 2,8

Adonitoxin ist demnach zu etwa 7,2 % am Gesamtglykosidgehalt beteiligt.

b) In situ-Fluoreszenzmessung von Oleandrin aus NERIUM OLEANDER

Die Untersuchungen von GÖRLICH [16] einerseits und MARQUWARDT [34] andererseits bezüglich des Oleandringehaltes von OLEANDER-Extrakten ergaben völlig unterschiedliche Resultate. So findet der eine Autor in einem wäßrig-äthanolischen Extrakt

nur geringe Mengen Oleandrin neben sehr großen Anteilen an Glucooleandrinen, während der andere aus einem athanolischen Trockenextrakt ausschließlich Oleandrin nachweisen konnte. Wir glaubten daher, eine zuverlässige Aussage über den Oleandringehalt dadurch machen zu können, daß wir einen aus gepulverter Droge frisch hergestellten Extrakt (s. exp. Teil I.2., Seite 123) untersuchten.

Im Verlauf unserer Untersuchungen ergab sich, daß der zunächst ermittelte Oleandringehalt bei Zimmertemperatur aufbewahrter Extrakte stetig zugunsten des Gehaltes an Desacetyloleandrin abnahm, während der Oleandringehalt kühl gelagerter Extrakte über mehrere Tage konstant blieb. Aufgrund dieser Tatsache erscheint es gerechtfertigt, zur Beurteilung eines Drogenextraktes das Verhältnis von Oleandrin zu Desacetyloleandrin heranzuziehen.

Die von uns untersuchten OLEANDER-Blätter wiesen einen mit Hilfe der BALJET-Reaktion [20] ermittelten Gesamtglykosidgehalt von 0,925 % auf, berechnet als Oleandrin (molarer Extinktionskoeffizient 16000, MG 576). Zur quantitativen Bestimmung des Oleandrins wurde der Gesamtglykosidextrakt im Fließmittelsystem Benzol-Essigester-Diäthylamin (70+20+10) aufgetrennt (s. Abb. 48) und nach dem Bedampfen des Chromatogrammes mit Salzsäure die Fluoreszenzortskurve der intensiv blau fluoreszierenden Flecke aufgenommen. Neben dem Oleandrin mit größtem R_f-Wert ergibt auch das Adynerin einen stark fluoreszierenden Fleck, während das Desacetyloleandrin in geringerem Maße am Glykosidgehalt beteiligt ist (Abb. 49).

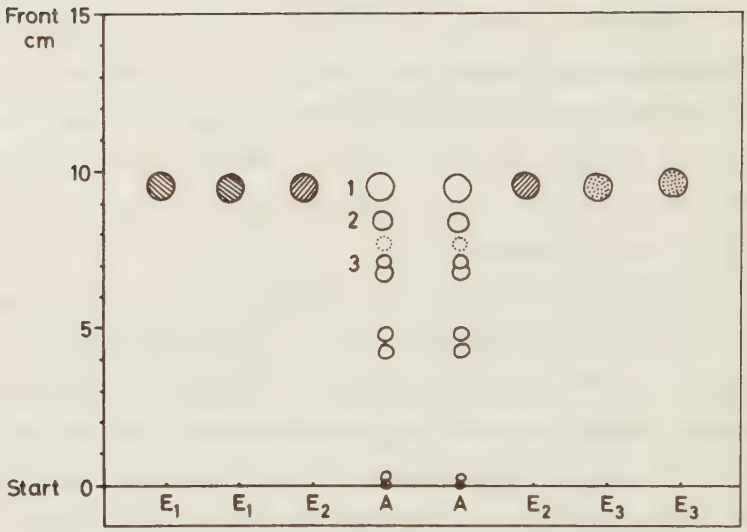


Abbildung 48 : Quantitative Bestimmung von Oleandrin aus OLEANDER-Extrakt
Schicht: Kieselgel GF_{254}-Fertigplatte
Fließmittel: Benzol-Essigester-Diäthylamin (70+20+10)
Detektion: HCl-Dampf, alle Flecken fluoreszieren blau, UV-Licht 366 nm
A = Analyse, E_1, E_2 und E_3 = Eichlösungen unterschiedlicher Konzentration (s. exp. Teil IV.1.b, Seite 151)
1 = Oleandrin, 2 = Adynerin,
3 = Desacetyloleandrin

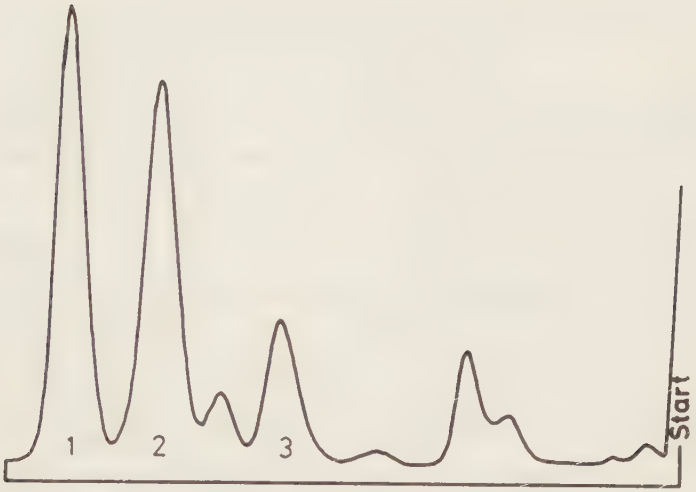


Abbildung 49 : Fluoreszenzortskurve des OLEANDER-Extraktes
1 = Oleandrin, 2 = Adynerin, 3 = Desacetyl-oleandrin

Die am Start verbliebenen stark polaren Cardenolide weisen ebenfalls intensive Fluoreszenz auf.

Die Auswertung der Fluoreszenzortskurven erfolgte über die Peakhöhen; auch hier wurde für jede Platte eine neue Eichgerade über drei Eichkonzentrationen erstellt (Konzentrationen, chromatographische Parameter und Densisometerdaten s. exp. Teil F.IV. 1-4.).

Bei der Auswertung von sechs Platten mit je zwei Analysen ergaben sich für Oleandrin aus Folia OLEANDRI die in Tabelle 2 aufgeführten Werte.

Tabelle 2

Platte	ug Oleandrin	g/100 g Droge
1	0,21	0,058
	0,22	0,060
2	0,22	0,060
	0,225	0,063
3	0,23	0,064
	0,23	0,064
4	0,24	0,067
	0,205	0,057
5	0,21	0,058
	0,21	0,058
6	0,21	0,058
	0,21	0,058

Mittelwert $\bar{x}$: 0,218 ug relative Standardabweichung s_{rel}: 5

Oleandrin ist demnach zu etwa 6,6 % am Gesamtglykosidgehalt beteiligt.

c) In situ-Remissionsmessung von Scillaren A und Proscillaridin A aus URGINEA MARITIMA

Wie bereits erwähnt ist es nicht möglich, eine Gesamtglykosidgehaltsbestimmung von Drogenextrakten, die Herzglykoside vom Bufadienolidtyp enthalten, mit Hilfe der BALJET-Reaktion [20] durchzuführen. Daher sollte hier eine quantitative Bestimmung von Scillaren A und Proscillaridin A vorgenommen werden, um eine brauchbare Aussage über die Güte einer Droge oder eines Drogenextraktes machen zu können. Hierbei galt unser besonderes Interesse dem Verhältnis von Scillaren A zu Proscillaridin A, das von GÖRLICH [16] mit etwa 6:1 angegeben wird.

Zur quantitativen Bestimmung wurde der Gesamtglykosidextrakt (s. exp. Teil I.2., Seite 123), der im Gegensatz zu ADONIS- und OLEANDER-Extrakten nur geringe Mengen an Ballaststoffen enthielt, im Fließmittelsystem Chloroform-Methanol-Wasser (80+19+1) (II) aufgetrennt. Nach dem Trocknen der Platten wurde die Remissionsortskurve bei einer Wellenlänge von 260 nm aufgenommen.

Das UV-Spektrum von Proscillaridin A (Abb. 50) weist das für Bufadienolide typische Maximum bei 300 nm auf. Interessanterweise war aber die Empfindlichkeit der Messung nicht bei 300 nm am größten, sondern bei 260 nm (etwa doppelt so hoch), wohl bedingt durch Adsorption an Kieselgel.

In Abb. 51 ist die Auftrennung des SCILLA-Extraktes im System II wiedergegeben, wobei erkenntlich ist, daß sich unmittelbar unterhalb des Fleckes von Proscillaridin A (1) ein weiterer Fleck befindet, der dem 19-Oxo-proscillaridin A (2)

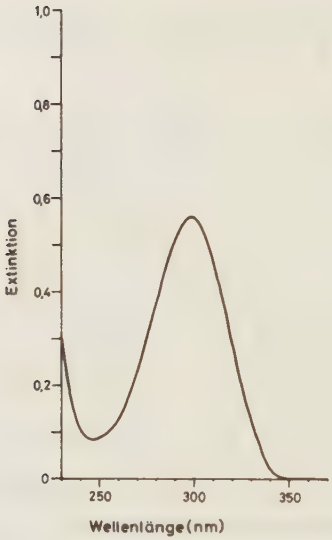


Abbildung 50 : UV-Absorptionsspektrum von Proscillaridin A (in Methanol, c = 1,2 mg / 25 ml)

zuzuordnen ist. Wie aus der Remissionsortskurve zu ersehen ist (Abb. 52a), sind die Peaks beider Substanzen nicht scharf voneinander getrennt. Durch einen zweiten Lauf der Platte im System Chloroform-Essigester (10+90) erreicht man jedoch eine einwandfreie Trennung beider Glykoside (Abb. 52b). Bei einer Auswertung über die Peakhöhen der Remissionsortskurven war die Abweichung der erhaltenen Werte so gering, daß aus zeitlichen Gründen auf die vollständige Trennung verzichtet wurde. Auch hier wurde für jede Platte eine neue Eichgerade über drei Eichkonzentrationen erstellt (s. exp. Teil. F.IV. 1-4.).

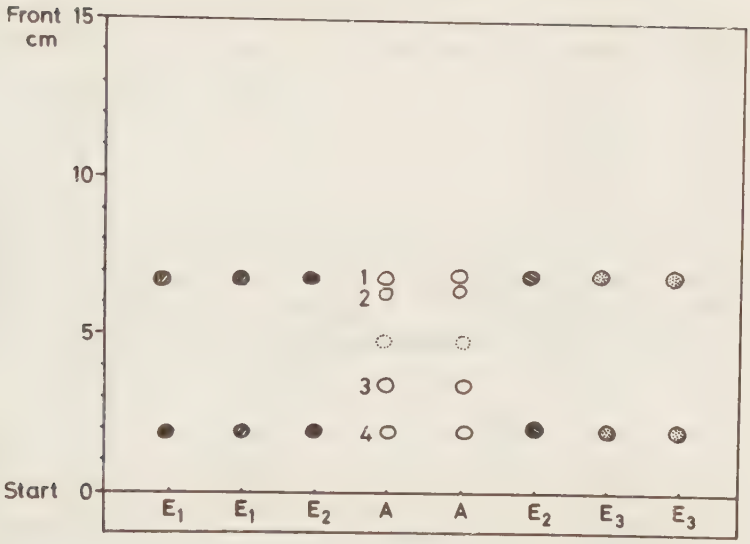


Abbildung 51 : Quantitative Bestimmung von Scillaren A und Proscillaridin A aus URGINEA MARITIMA
Schicht: Kieselgel GF_{254}-Fertigplatte
Detektion: Antimontrichlorid-Reagenz
A = Analyse, E_1, E_2 und E_3 = Eichlösungen unterschiedlicher Konzentration (s. exp. Teil IV.1.c, Seite 151)
1 = Proscillaridin A, 2 = 19-Oxo-proscillaridin A, 3 = Scillicyanosid,
4 = Scillaren A

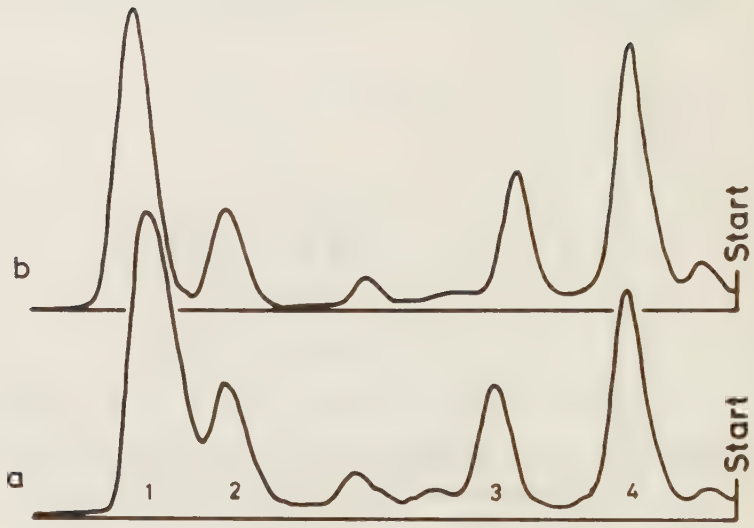


Abbildung 52 : Remissionsortskurve des SCILLA-Extraktes

1 = Proscillaridin A,
2 = 19-Oxo-proscillaridin A
3 = Scillicyanosid
4 = Scillaren A

a = 1. Lauf, b = 1. und 2. Lauf

Bei der Auswertung von 5 Platten mit je zwei Analysen ergaben sich für Scillaren A aus Bulbus SCILLAE die in Tabelle 3 aufgeführten Werte.

Tabelle 3

Platte	ug Scillaren A	g/100 g Droge
1	0,365	0,104
	0,365	0,104
2	0,375	0,105
	0,41	0,117
3	0,42	0,120
	0,41	0,117
4	0,355	0,101
	0,365	0,104
5	0,36	0,103
	0,385	0,110

Mittelwert $\bar{x}$: 0,381 relative Standardabweichung s_{rel}: 6,3

Das entspricht einem Gehalt von 0,109 % Scillaren A.

Bei der Auswertung von 8 Platten mit je zwei Analysen ergaben sich für Proscillaridin A aus Bulbus SCILLAE die in Tabelle 4 aufgeführten Werte.

Tabelle 4

Platte	ug Proscillaridin A	g/100 g Droge
1	0,58	0,166
	0,59	0,168
2	0,59	0,168
	0,585	0,167
3	0,60	0,171
	0,575	0,164
4	0,58	0,166
	0,59	0,168
5	0,55	0,157
	0,565	0,161
6	0,59	0,168
	0,59	0,168
7	0,61	0,174
	0,63	0,180
8	0,64	0,183
	0,585	0,167

Mittelwert $\bar{x}$: 0,591 relative Standardabweichung s_{rel}: 3,7

Das entspricht einem Gehalt von 0,169 % Proscillaridin A. Hieraus ergibt sich ein Verhältnis von Scillaren A zu Proscillaridin A von etwa 1 : 1,5.

d) Indirekte spektralphotometrische Bestimmung von Proscillaridin A aus URGINEA MARITIMA

Zum Vergleich mit dem durch Direktauswertung erhaltenen Resultat wurde eine Bestimmung von Proscillaridin A nach der üblichen Transfertechnik mit anschließender Verseifung des Cumalinringes durch Kalilauge [35] und photometrischer Extinktionsmessung der erhaltenen Lösung durchgeführt. Bemerkenswert ist an dieser Methode die Tatsache, daß die Aufspaltung des Lactonringes die Empfindlichkeit der Messung etwa um den Faktor 8 ansteigen läßt. Nachteilig ist an dieser Methode einerseits der relativ hohe Zeitaufwand, andererseits besteht die Gefahr, beim Auskratzen der Proscillaridin-A-Zonen den darunterliegenden Fleck des 19-Oxo-proscillaridin A ganz oder teilweise mitzuerfassen.

Bei der Durchführung von fünf Analysen wurde ein Mittelwert von 0,175 % Proscillaridin A gefunden, wobei eine Streuung der Einzelwerte von ± 10 % zu verzeichnen war. Der Vergleich der beiden Methoden zeigt, daß die Direktauswertung der hier geschilderten Methode an Genauigkeit überlegen ist und darüberhinaus auch wesentlich geringeren Zeitaufwand erfordert.

e) In situ-Fluoreszenzmessungen von Adonitoxin und Oleandrin aus dem Kombinationspräparat MIROTON ®

Bei der Überprüfung der erarbeiteten Verfahren auf ihre Anwendbarkeit zur quantitativen Bestimmung der Glykoside Adonitoxin, Oleandrin, Scillaren A und Proscillaridin A aus

dem Extrakt eines Kombinationspräparates zeigte sich, daß eine Remissionsmessung und damit eine Bestimmung von Scillaren A und Proscillaridin A nicht in Betracht kam. Die beiden Glykosiden entsprechenden Chromatogrammzonen waren von Ballaststoffen des ADONIS-, CONVALLARIA- und OLEANDER-Extraktes überlagert, die ähnliche Absorptionsmaxima aufwiesen wie Scillaren A und Proscillaridin A. Dagegen war eine Übertragung der in situ-Fluoreszenzmessungen der Cardenolide Adonitoxin und Oleandrin unter den angegebenen Bedingungen ohne weiteres möglich, da bei der dünnschichtchromatographischen Trennung des Gesamtglykosidextraktes keine Überlagerungen von Glykosidzonen zu verzeichnen war.

Demnach ist eine Qualitätskontrolle, gerade im Hinblick auf die besonders labilen Cardenolide der Extrakte von Herba ADONIDIS und Folia OLEANDRI, durch dünnschichtchromatographische Direktauswertung auch von Kombinationspräparaten generell durchführbar.

Experimenteller Teil

F. Experimenteller Teil

I. Aufarbeitung und Extraktion der Drogen

I.1. ADONIS-Extrakte

Als Ausgangsmaterial diente uns ein ADONIS-Konzentrat der Firma CHEMISCHE WERKE MINDEN mit einem Äthanolgehalt von ca. 35 % (1 ml Konzentrat entspricht 3,3 g Herba Adonidis mit einer Restfeuchte von 6-10 %). Zur Isolierung von Cardenolidglykosiden sollte möglichst frisches Material verwendet werden, um eine Zersetzung von Glykosiden bei der Lagerung zu vermeiden. Daher war es notwendig, eine Überprüfung des Gesamtglykosidgehaltes der jeweils verwendeten Charge vorzunehmen.

Hierzu wurden 5,00 ml des Konzentrates mit Wasser zu 100 g ergänzt und Ballaststoffe mit 20 g einer wäßrigen 15proz. Blei-(II)-acetatlösung gefällt. Nach dem Zentrifugieren entfernten wir aus 100 g Filtrat überschüssige Bleiionen durch Zugabe von 25 g einer wäßrigen 10proz. Lösung von Dinatriumhydrogenphosphat (-dihydrat) und zentrifugierten abermals. Darauf wurden 100 g der klaren, blaßgelb gefärbten Glykosidlösung zunächst zur Entfernung des zur Stabilisierung zugesetzten NIPAGINS ® dreimal mit je 20 ml Petroläther ausgeschüttelt. Anschließend erfolgte die Extraktion der Cardenolide durch viermaliges Ausschütteln mit je 50 ml Chloroform-Isopropanol (3+2). Die cardenolidhaltigen organischen Phasen wurden vereinigt und unter vermindertem Druck zur Trockne eingedampft.

Zur Gehaltsbestimmung mit Hilfe der BALJET-Reaktion [20] überführten wir den Rückstand mit Methanol quantitativ in einen 100 ml Meßkolben, füllten zur Marke auf, pipettierten von dieser Lösung 5,00 ml in einen 25 ml Meßkolben und ergänzten wiederum mit Methanol zur Marke. 3,00 ml dieser Glykosidlösung wurden darauf mit der gleichen Menge Baljet-Reagenz (95 ml 1proz. Pikrinsäurelösung + 5 ml 10proz. Natronlauge) versetzt und die Extinktion nach 22 Minuten bei einer Wellenlänge von 494 nm gegen einen Leerwert bestimmt (Spektralphotometer PM Q II der Firma ZEISS).

Die Berechnung des Gesamtglykosidgehaltes (GGG) als Adonitoxin erfolgte nach der folgenden Formel für 6 ml Farblösung:

$$GGG\ [g/100\ ml] = E_{(1\ cm)} \cdot f'$$

Hierin ist E die Extinktion bei einer Schichtdicke von 1 cm und f' ein Umrechnungsfaktor mit einem Wert von 1,246. Dieser resultiert unter Berücksichtigung der gewählten Verdünnung aus dem Faktor f des Adonitoxins, der sich nach TÜRK (Dissertation 1971) [21] aus dem prozentuellen Extinktionskoeffizienten mit 249 errechnet.

Größere Mengen des Konzentrates wurden zur Isolierung von Cardenolidglykosiden analog der vorgegebenen Vorschrift aufgearbeitet.

Abweichend hiervon ermittelten wir die jeweils ausreichende Menge an $Pb(CH_3COO)_2$ und $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$ für die entsprechende Charge empirisch durch Ausbleiben einer Fällung auf weitere Reagenzzugabe im Filtrat. Die entstandenen Niederschläge

wurden abgenutscht und mehrmals nachgewaschen. Die so erhaltene Lösung schüttelten wir zur groben Auftrennung des Gesamtglykosidkomplexes nacheinander jeweils dreimal mit den entsprechenden Mengen Chloroform, Chloroform-Äthanol (2+1) und Chloroform-Äthanol (3+2) aus. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck zur Trockne eingedampft. Die resultierenden mehr oder weniger sirupösen Rückstände lieferten drei Glykosidfraktionen, von denen der Chloroform- und der Chloroform-Äthanol-(2+1)-Extrakt säulenchromatographisch aufgetrennt wurden.

Zur quantitativen Bestimmung des Adonitoxins aus dem ADONIS-Konzentrat wird der Rückstand von 5,00 ml Konzentrat nach der Vorschrift zur Gesamtglykosidgehaltsbestimmung aufgearbeitet, in ein 2 ml Meßkölbchen mit Chloroform-Methanol (1+1) überführt und bis zur Marke aufgefüllt.

I.2. OLEANDER-, SCILLA- und STROPHANTHUS-Extrakte

Folia Oleandri, Bulbus Scillae, Semen Strophanthi hispidi und Semen Strophanthi kombé wurden in einer Culatti-Schlagmühle (Firma JANKE und KUNKEL K.G.) fein pulverisiert.

OLEANDER- und SCILLA-Stammlösungen zur quantitativen Bestimmung von Oleandrin bzw. Scillaren A und Proscillaridin A wurden wie folgt hergestellt (bei abweichenden Mengenangaben Zahlen für Folia Oleandri in Klammern):

5,00 g fein gepulverte Droge wurden mit 70proz. Äthanol 15 Minuten unter Rückfluß zum Sieden erhitzt und nach dem

Abkühlen mit Wasser zu 200 g aufgefüllt. Nach Zusatz von 10 g (20 g) einer wäßrigen 15proz. Blei-(II)-acetatlösung wurde der Niederschlag abzentrifugiert. 180 g der überstehenden klaren Lösung versetzten wir mit 20 g (25 g) einer 10proz. wäßrigen Lösung von Dinatriumhydrogenphosphat (-dihydrat) und zentrifugierten nach Umschwenken abermals. 163,5 g (180 g) der Lösung entsprechend 3,5 g (3,6 g) Droge wurden zur Entfernung des Äthanols unter vermindertem Druck auf etwa 100 ml eingeengt und dreimal mit je 50 ml Chloroform-Isopropanol (3+2) ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen dampften wir unter vermindertem Druck zur Trockne ein und überführten den resultierenden Rückstand quantitativ in einen 10 ml (5 ml) Meßkolben, der mit Chloroform-Methanol (1+1) zur Marke aufgefüllt wurde.

STROPHANTHUS-Extrakte zur vergleichenden Dünnschichtchromatographie wurden in ähnlicher Weise hergestellt. Abweichend extrahierten wir das Drogenpulver zur Entfernung des in den Samen enthaltenen fetten Öles mit Petroläther und verwendeten nach dem Abzentrifugieren der Niederschläge mit Blei-(II)-acetat- und Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung die gesamte Menge der überstehenden klaren Lösungen.

Zur Isolierung von Cardenolidglykosiden aus den Samen von STROPHANTHUS HISPIDUS wurden 50 g der fein gepulverten Samen wie beschrieben aufgearbeitet. Hier schüttelten wir genau wie bei der Aufbereitung der ADONIS-Konzentrate zur groben Vortrennung des Gesamtglykosidkomplexes ebenfalls mit Chloroform, Chloroform-Äthanol (2+1) und Chloroform-Äthanol (3+2) aus.

I.3. MIROTON ® -Extrakt

Zur quantitativen Bestimmung des Adonitoxins und des Oleandrins aus einem Kombinationspräparat stand uns ein MIROTON ® -Konzentrat der Firma CHEMISCHE WERKE MINDEN zur Verfügung. Die Ermittlung des Gesamtglykosidgehaltes, bezogen auf Adonitoxin, sollte nur annähernd Aufschluß darüber geben, für welchen Konzentrationsbereich die Stammlösung herzustellen war.

Wir nahmen die Aufarbeitung, Extraktion und Gehaltsbestimmung ganz analog der für das ADONIS-Konzentrat der gleichen Firma gegebenen Vorschrift vor.

II. Allgemeine Methoden zur Isolierung und Identifizierung von Verbindungen aus den Extrakten

II.1. Dünnschichtchromatographie

Die dünnschichtchromatographischen Analysen von Glykosiden, Aglyka und Zuckerkomponenten wurden auf Kieselgel-GF_{254}-Platten durchgeführt. Wir verwendeten sowohl selbstbeschichtete Platten, mit dem Streichgerät der Firma DESAGA hergestellt, als auch Fertigplatten und Fertigfolien der Firma MERCK.

Je nach Trennproblem kamen folgende Fließmittelsysteme zum Einsatz (Angaben als Volumteile):

a) Cardenolide

System I	Chloroform-Methanol-Wasser (85+14+1) für Aglyka und schwach polare Glykoside
System II	Chloroform-Methanol-Wasser (80+19+1)
System III	Methyläthylketon-Toluol-Wasser-Methanol-Eisessig (40+5+ 3+2,5+1) nach GÖRLICH [16]
System IV	Chloroform-Isopropanol (2+1)
System V	Essigester-Pyridin-Wasser (5+1+4), Oberphase für mittel und stark polare Glykoside

Die Detektion der Glykoside und Aglyka erfolgte mit KEDDE-Reagenz [22] (Aufsprühen der Lösungen I und II nacheinander; I: 2proz. Lsg. von 3,5-Dinitrobenzoesäure in CH_3OH, II: 1 N methanolische Natronlauge) und Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz (2proz. Lösung von Vanillin in konzentrierter Schwefelsäure; Erhitzen im Trockenschrank bei 105° C zur optimalen Farbtiefe).

Die unterschiedlichen Farben der Cardenolide mit den genannten Reagenzien sind unter II.6.a) bzw. II.6.c) beschrieben (Seite 135, 137).

b) Zucker

System VI Essigester-Isopropanol-Methanol (70+15+15) [40]

Neben den zur Auftrennung der Cardenolide verwendeten DC-Platten wurden hier zusätzlich selbstbeschichtete, mit 0,02 mol Natriumacetatlösung imprägnierte Kieselgel-GF_{254}-Platten eingesetzt.

Der Nachweis der Zucker erfolgte durch Besprühen der Platten mit Xanthydrol-Reagenz (0,1proz. Lösung von Xanthydrol in 90 ml Äthanol und 10 ml konzentrierter Salzsäure) und dem Reagenz nach SCHEFFER und KIKUTH [27] (Lösung von 0,3 g 4-Aminohippursäure und 3,0 g Phthalsäure in 100 ml Äthanol). Die nach dem Erhitzen der Platten zur optimalen Farbintensität bei 120° C erhaltenen Färbungen und Fluoreszenzen sind aus II.6.d) und II.6.e) zu ersehen (Seite 138).

II.2. Präparative Schichtchromatographie

Zur weiteren Anreicherung der Glykoside aus den Säulenfraktionen verwendeten wir je nach Trennproblem selbstbeschichtete Platten von 0,25 mm oder 0,5 mm Schichtdicke sowie Fertigplatten von 0,25 mm Schichtdicke. Als Fließmittel kamen hier die Systeme I, II und VI je nach Polarität des zu iso-

lierenden Cardenolides zum Einsatz. Die getrennten Substanzen wurden durch Ansprühen eines Randstreifens mit KEDDE-Reagenz [22] sichtbar gemacht, die markierten Zonen ausgekratzt und in kleine Glassäulen gefüllt. Die Elution nahmen wir mit Chloroform-Methanol (1+1) vor.

II.3. Papierchromatographie

Papierchromatographische Trennungen erfolgten auf dem Papier SCHLEICHER und SCHÜLL 2043 b Mgl, das Chromatogrammformat betrug generell 18 x 60 cm wobei die Startlinie 11 cm vom Rand entfernt war. Die Chromatogramme wurden nach Bedarf in Bahnen eingeteilt und bei Verwendung der Durchlauftechnik die unteren Kanten mit einer Zackenschere abgeschnitten, was bei absteigender Entwicklung ein ungehindertes Abtropfen des Fließmittels ermöglicht.
Je nach Trennproblem kamen folgende Fließmittelsysteme zum Einsatz:

a) ADONIS-Glykoside

System I Pentanol-Benzol-Wasser (1+1+2), Oberphase
Papier zu 60 % mit der Unterphase imprägniert

System II Butanol-Xylol-Wasser (1+1+2), Oberphase
Papier zu 60 % mit der Unterphase imprägniert

b) Glykoside des Chloroform-Extraktes von STROPHANTHUS HISP.

System III Benzol-Tetrahydrofuran (1+1)
Papier zu 33 % mit Formamid imprägniert

c) Zucker, mit Ausnahme der 2-Desoxy- und 2,6-Didesoxy-Zucker

System IV Toluol-Butanol-Wasser (1+2+2), Oberphase Papier zu 35 % mit Wasser imprägniert

d) 3-O-Methyl-2,6-didesoxyhexosen

System V Toluol-Methyläthylketon-Wasser (1+1+2), Oberphase Papier mit Aceton-Wasser (2+1) zu 33 % mit Wasser imprägniert

II.4. Präparative Papierchromatographie

Die präparative Aufarbeitung des Chloroform-Extraktes von STROPHANTHUS HISPIDUS nahmen wir ebenfalls auf Papieren vom Format 18 x 60 cm vor. In der Mitte und an beiden Rändern der Chromatogramme wurden 1 cm breite Zonen eingezeichnet. Zur Gewinnung der Cardenolide trugen wir Extraktlösung über die gesamte Breite der Startlinie auf, chromatographierten im System III, trockneten die Papiere 1 Stunde bei 120 °C im Trockenschrank und zerschnitten sie entlang der eingezeichneten Markierungen. Die so erhaltenen 1 cm breiten Streifen dienten als Leitchromatogramme zur Lokalisierung der Glykosidzonen. Hierzu wurden die Streifen mit $SbCl_3$-Reagenz (25proz. Lösung von Antimontrichlorid in Chloroform) besprüht und bei 105 °C im Trockenschrank bis zur optimalen Farbintensität erhitzt. Die Leitchromatogramme übertrugen wir auf die verbliebenen unbesprühten Bahnen, trennten die entsprechenden Glykosidzonen heraus und zerkleinerten sie. Die Elution

der Glykoside erfolgte mit Chloroform-Methanol (1+1) über 24 Stunden in Jodzahlkolben entsprechender Größe.

II.5. Säulenchromatographie von ADONIS-Extrakten

a) an Kieselgel (SC 1 und SC 2)

Das zur Chromatographie benötigte Kieselgel wurde nach einer Vorschrift von STOLL und Mitarb. [25] selbst hergestellt. Hierzu dienten 500 ml käufliches Wasserglas, die mit 1 l destilliertem Wasser verdünnt und darauf filtriert wurden. Der auf Zusatz von 150 ml 18proz. Salzsäure ausfallenden festen Gallerte fügt man unter ständigem Rühren weitere 200 ml Säure hinzu und nutscht das Gel nach einer Stunde intensiven Rührens ab. Darauf wird mit Wasser bis zur Chloridfreiheit gewaschen, die Masse zwei Tage bei 120 °C im Trockenschrank getrocknet und durch ein Sieb mit einer Maschenweite von 0,3 - 0,4 mm passiert. Das erhaltene Kieselgel (ca. 190 g) war in der Lage, etwa 170 % seines Gewichtes an Wasser aufzunehmen.

Zur Chromatographie SC 1 und SC 2 wurden Glassäulen von 2 cm Durchmesser verwendet, die Säulenfüllung bestand aus jeweils 36 g Kieselgel bei einer Füllhöhe von 25 cm. Eingesetzt wurden je 56 mg Gesamtglykoside, berechnet als Adonitoxin.

SC 1: Kieselgel wasserfrei, Glykosidextrakt in wenig Methanol auf die Säule gebracht, mobile Phase Toluol-Methyläthylketon (1+1)

SC 2: Kieselgel wassergesättigt, Glykosidextrakt an Kieselgel adsorbiert, mobile Phase Toluol-Methyläthylketon (1+1), wassergesättigt

Bei einer Fraktionsgröße von 20 ml wurden jeweils 30 Fraktionen aufgefangen und dünnschichtchromatographisch in den Systemen I und II kontrolliert. Die Detektion der Cardenolide erfolgte durch Besprühen der Chromatogramme mit KEDDE-Reagenz [22] und Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz.

b) an Aluminiumoxid (SC 3 - SC 6)

Als Trägermaterial verwendeten wir neutrales Aluminiumoxid der Firma MERCK mit der Aktivitätsstufe II, was einem Wassergehalt von 3 % entspricht. Das Sorptionsmittel wurde jeweils mit frisch destilliertem Chloroform angeschlämmt und in die Glassäulen eingetragen. Nach mehrmaligem Waschen zur Entfernung löslicher Anteile brachten wir den zu chromatographierenden Extrakt in wenig Chloroform-Methanol (1+1) gelöst auf die Säule. Als mobile Phase dienten Chloroform und Chloroform-Methanol-Gemische mit steigendem Methanolanteil. Die Fraktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch in den Systemen I, II und III, die Detektion der Cardenolide mit KEDDE-Reagenz [22] und Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz.

SC 3

Säulenfüllung: 120 g Aluminiumoxid neutral, Aktivitätsstufe II

Säulendurchmesser: 3 cm, Füllhöhe: 21 cm

Aufgetragen: ca. 400 mg Chloroform-Äthanol (2+1)-Extrakt entsprechend 120 mg Glykosiden

Fraktionen zu 50 ml

insgesamt:

Chloroform	:	8 Fraktionen
Chloroform-Methanol (95+5)	:	25 Fraktionen
Chloroform-Methanol (80+20)	:	10 Fraktionen
Chloroform-Methanol (70+30)	:	60 Fraktionen

SC 4

Säulenfüllung: 1,3 kg Aluminiumoxid neutral, Aktivitätsstufe I

Säulendurchmesser: 4,5 cm, Füllhöhe: 65 cm

Aufgetragen: ca. 3,2 g Chloroform-Äthanol (2+1)-Extrakt
entsprechend 1,3 g Glykosiden

Fraktionen zu 600 ml

insgesamt:

Chloroform	:	10 Fraktionen
Chloroform-Methanol (99+1)	:	45 Fraktionen
Chloroform-Methanol (98+2)	:	50 Fraktionen
Chloroform-Methanol (95+5)	:	20 Fraktionen
Chloroform-Methanol (80+20)	:	15 Fraktionen
Chloroform-Methanol (70+30)	:	50 Fraktionen

SC 5

Säulenfüllung: 5 kg Aluminiumoxid neutral, Aktivitätsstufe II

Säulendurchmesser: 10 cm, Füllhöhe: 70 cm

Aufgetragen: ca. 26,5 g Chloroform-Äthanol (2+1)-Extrakt
entsprechend 5,2 g Glykosiden

Fraktionen zu 2,5 l

insgesamt:

Chloroform	:	10 Fraktionen
Chloroform-Methanol (99+1)	:	40 Fraktionen
Chloroform-Methanol (98+2)	:	20 Fraktionen
Chloroform-Methanol (90+10)	:	10 Fraktionen
Chloroform-Methanol (80+20)	:	20 Fraktionen
Chloroform-Methanol (70+30)	:	55 Fraktionen

SC 6

Zur Auftrennung des Chloroform-Extraktes wurde die unter SC 5 beschriebene Säule mit insgesamt 50 l Benzol-Chloroform (1+1) gewaschen und anschließend der Extrakt in wenig Chloroform gelöst auf die Säule gebracht.

Aufgetragen: 11,5 g Chloroform-Extrakt
entsprechend 2,1 g Glykosiden

Fraktionen zu 2,5 l

insgesamt:

Benzol-Chloroform (1+1)	:	20 Fraktionen
Chloroform	:	50 Fraktionen
Chloroform-Methanol (99+1)	:	45 Fraktionen
Chloroform-Methanol (98+2)	:	25 Fraktionen

Zum Auffangen der einzelnen Fraktionen von SC 5 und SC 6 benutzten wir einen Fraktionssammler Fraktomat Y-3 der Firma HAKO, der so modifiziert wurde, daß der Zeitaufwand zur Chromatographie durch kontinuierlichen Tag- und Nachtbetrieb

relativ gering gehalten werden konnte [+]. Hierzu wurde der Fraktionssammler mit einem Flüssigkeitsmelder gekoppelt, der bei Erreichen einer beliebig festzusetzenden Marke ein Umschalten auf das nächste Auffanggefäß ermöglichte. In jedem Auffanggefäß befand sich zu diesem Zweck ein NTC-Widerstand von 500 Ohm, in betriebsbereitem Zustand des Gerätes aufgeheizt, der beim Eintauchen in das Eluat abgekühlt wurde. Über eine geeignete Schaltstufe erhielt der Fraktionssammler den Impuls zum Ansteuern des nächsten Auffanggefäßes.
Die Abb. 53 zeigt den betriebsbereiten Fraktionssammler, Abb. 54 den Schaltplan des Flüssigkeitsmelders.

+) Meinem Mitdoktoranden, Herrn Alfred MÜLLER, danke ich an dieser Stelle herzlich für die freundliche Überlassung des von ihm konstruierten Flüssigkeitsmelders.

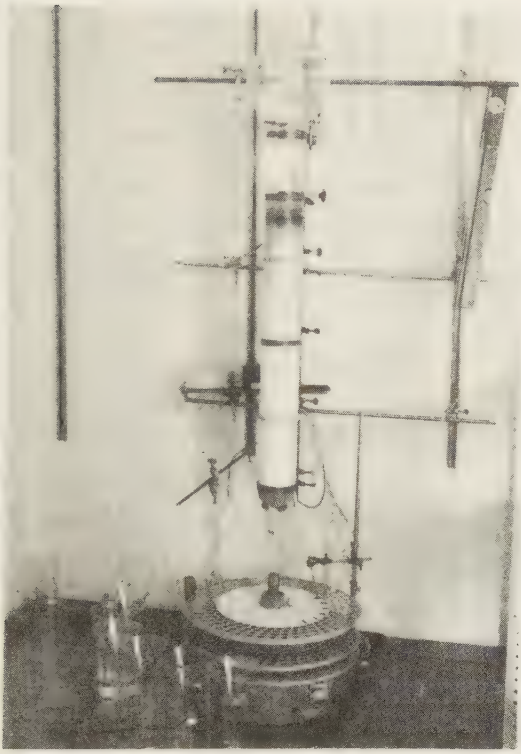


Abb. 53

II.6. Farbreaktionen

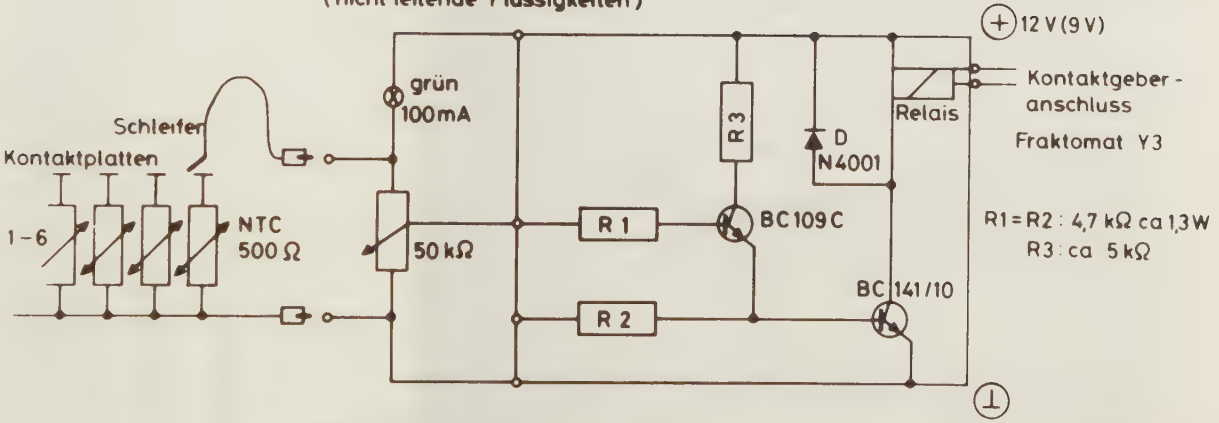
a) KEDDE-Reagenz [22]

Aufgrund der reaktiven Methylengruppe im einfach ungesättigten Fünferlactonring ergeben alle Cardenolide mit alkalischer 3,5-Dinitrobenzoesäurelösung eine blaue bis blauviolette Färbung [36].

Abb. 54

Flüssigkeitsmelder

(nicht leitende Flüssigkeiten)



Die grüne Lampe im Schaltteil zeigt Funktionsfähigkeit des betreffenden NTC's
Brennen beide grünen Lampen (Schaltteil u. Y3), ist Fraktomat schaltfähig

b) Antimontrichlorid-Reagenz

Mit Antimontrichlorid liefern Glykoside verschiedener Aglyka nach Erhitzen unterschiedliche Färbungen und erlauben somit eine Differenzierung. Das Reagenz ist vornehmlich zur Detektion von Papierchromatogrammen verwendbar, da es auf Dünnschichtchromatogrammen nur schwache, sehr schnell verblassende Färbungen ergibt.

c) Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz

Ähnlich wie Antimontrichlorid erlaubt auch Vanillin-Schwefelsäure in Verbindung mit KEDDE-Reagenz [22] eine Differenzierung der Cardenolide nach ihren Aglyka. Die Färbungen, die mit beiden Reagenzien nach Erhitzen auf 105 °C erhalten werden, sind durchwegs ähnlich, doch liefert Vanillin-Schwefelsäure auf Dünnschichtchromatogrammen wesentlich intensivere Farben.

Eine Veränderung des Aglykons zieht zwangsläufig eine Farbänderung nach sich. Am Beispiel der in ADONIS VERNALIS vorkommenden Aglyka sei dies kurz aufgezeigt.

Strophanthidin ergibt mit Vanillin-Schwefelsäure eine intensiv grüne Färbung. Die Reduktion der Aldehydfunktion, die z.B. mit Natriumboranat möglich ist, liefert das Strophanthidol, welches durch das Reagenz grau angefärbt wird. Die zusätzliche Hydroxylgruppe des 16-OH-Strophanthidins bedingt eine Rotfärbung, während das dem Strophanthidin isomere Adonitoxigenin mit dem Reagenz eine violette Färbung zeigt.

Da sich die von diesen Aglyka abgeleiteten Glykoside analog verhalten, kann die Anfärbung von Cardenoliden mit

Vanillin-Schwefelsäure bzw. Antimontrichlorid einen ersten Hinweis auf die mögliche Struktur unbekannter Substanzen geben.

d) Xanthydrol-Reagenz

Die Xanthydrolreaktion erlaubt nicht nur eine Differenzierung zwischen 2-Desoxyzuckern und solchen Zuckern, die am C-Atom 2 eine Hydroxylgruppe tragen, sondern sie kann auch zur Identifizierung solcher Glykoside herangezogen werden, die 2-Desoxyzucker enthalten. Hierzu reichen geringe Mengen (1 µg) auf Kieselgelschichten getrennter Substanzen aus. Nach dem Erhitzen auf 120 °C ergeben die 2-Desoxyzucker enthaltenden Glykoside je nach Konzentration mehr oder weniger intensiv rot gefärbte Fleckzonen.

Im Falle der Strophanthobiose (-Cymarose-Glucose) und Digilanidobiose (-Digitoxose-Glucose) versagt die Reaktion [37] Hier muß eine Spaltung des Glykosides zum Nachweis des 2-Desoxyzuckers vorgenommen werden.

e) 4-Aminohippursäure-Phthalsäure-Reagenz [27]

Dieses Reagenz besitzt ähnliche Empfindlichkeit wie das Xanthydrolreagenz. Je nach aufgetragener Menge erscheinen die Zucker nach dem Erhitzen der Chromatogramme als gelbe bis gelbbraune Flecken. Mengen unter 2 µg sind bei Tageslicht kaum noch zu erkennen, zeigen jedoch im UV-Licht bei 366 nm intensiv gelbe Fluoreszenz. Zur Identifizierung von 2-Desoxy-Zuckern hat es sich bewährt, die Flecken zunächst

mit 4-Aminohippursäure-Phthalsäure-Reagenz [27] zu lokalisieren und darauf mit Xanthydrol-Reagenz zu besprühen. Die Selektivität des Reagenzes bleibt bei gleicher Empfindlichkeit unbeeinflußt.

II.7. Spaltung von Glykosiden durch saure Hydrolyse

Die Identifizierung von Aglykon und Zuckerkomponente unbekannter Glykoside sollte aufgrund geringer Substanzmengen möglichst aus einem Reaktionsansatz erfolgen. Daher kam eine Spaltung unter den üblichen Bedingungen nicht in Betracht, da diese jeweils nur Anhydroprodukte des Aglykons liefern. Auch die schonende Hydrolyse nach MANNICH und SIEWERT [24] ergibt nicht immer zuverlässige Resultate und besitzt darüberhinaus den Nachteil eines relativ hohen Zeitaufwandes. Deshalb wurde in Modellversuchen an k-Strophanthin-ß, Cymarin und dem DIGITALIS-Glykosid Glucoverodoxin (Gitaloxigeninglucodigitalosid) unter Abwandlung der KILIANI-Spaltung ein Verfahren entwickelt, das nunmehr den Nachweis von Aglykon und Zuckerkomponente aus einem Reaktionsansatz nach folgender Vorschrift erlaubt:

Etwa 1 mg Glykosid wird mit 1 ml 0,5 N Salzsäure versetzt und für 1 Stunde bei 50 °C im Trockenschrank belassen. Anschließend ergänzt man die Lösung mit Wasser zu 5 ml und schüttelt dreimal mit je 5 ml Chloroform aus. Der Nachweis des Aglykons kann dann aus dem Rückstand der vereinigten organischen Phasen erfolgen.

Zur Identifizierung des Zuckers wird die noch saure wäßrige Lösung mit Ionenaustauscher-Harz AMBERLITE ® Type

IRA-410 (in der OH^- Form) der Firma SERVA bis zur Neutralisation versetzt und nach Filtration unter vermindertem Druck zur Trockne gebracht. Zur Chromatographie wird der Rückstand in 0,1 ml Methanol-Wasser (1+1) gelöst.

II.8. Reduktion mit Natriumboranat

Die Reduktion der Aldehydfunktion des Strophanthidins führt, wie bereits unter 6.c) erwähnt, zum Strophanthidol. Diese Tatsache äußert sich einerseits im chromatographischen Verhalten (geringere Laufstrecken durch polarere Eigenschaften), andererseits in der unterschiedlichen Färbung mit Vanillin-Schwefelsäure.

Die Glykoside "grün I", "grün II" und "grün III", die als Aglykon Strophanthidin enthalten, wurden nach folgender Vorschrift von WEHRLI, SCHINDLER und REICHSTEIN [38] einer Reduktion mit Natriumborhydrid unterworfen:

Die Lösung von ca. 1 mg Glykosid in 0,2 ml 80proz. Äthanol versetzten wir unter guter Kühlung des Reaktionsgefäßes mit einer Lösung von 2,25 mg Natriumboranat in 0,1 ml 80proz. Äthanol und ließen anschließend 5 Stunden bei 0 °C stehen.

Darauf wurde 1 N Schwefelsäure bis zur sauren Reaktion (etwa pH 3) zugetropft und zur Entfernung des Äthanols nach Zusatz von 4 ml Wasser unter vermindertem Druck eingeengt. Die wäßrige Lösung schüttelten wir dreimal mit je 5 ml Chloroform-Äthanol (9+1) aus und engten die vereinigten organischen Phasen unter vermindertem Druck zur Trockne ein. Das Reak-

tionsprodukt wurde dünnschichtchromatisch untersucht. Zum Vergleich des Aglykons mit authentischem Strophanthidol hydrolysierten wir Cymarol und die drei erhaltenen Reaktionsprodukte nach 7. und chromatographierten auf Kieselgelfertigplatten der Firma MERCK im System I.

II.9. Spektroskopische Methoden und Schmelzpunktbestimmung

a) UV-Spektren

Die UV-Absorptionsspektren wurden mit dem Spektralphotometer der Firma PERKIN ELMER Modell 124 aufgenommen. Es wurden Konzentrationen von etwa 1 mg Substanz (genau gewogen) in 25,00 ml Methanol (zur Spektroskopie) vermessen.

b) IR-Spektren

Zur Aufnahme der IR-Spektren mit dem Modell 700 der Firma PERKIN ELMER wurden die Substanzen mit Kaliumbromid zu Tabletten verpreßt. Im Falle des Desglucocheirotoxins mußten aus Mangel an Vergleichssubstanz Preßlinge mit Bleireduzierringen hergestellt werden.

c) FD-Massenspektren +)

Die Aufnahme der Felddesorptions-Massenspektren erfolgte mit dem Gerät VARIAN-MAT 711 bei unterschiedlichen Tempera-

---

+) Herrn Dr. STEINBACH vom Fachbereich Chemie der PHILIPPS-UNIVERSITÄT MARBURG danke ich für die Aufnahme der Spektren.

turen. Hierzu wurden die Substanzen als möglichst konzentrierte Lösungen in Chloroform auf mit Benzonitril aktivierte Wolframfäden von 10 µm Durchmesser aufgebracht.

d) Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunkte, mit dem Mikroskopheiztisch 350 der Firma LEITZ ermittelt, sind unkorrigiert angegeben.

Die Substanzen wurden vor den Analysen im Hochvakuum getrocknet.

III. Aufarbeitung einzelner Säulenfraktionen

III.1. Isolierung und Identifizierung von Strophanthidin-digitalosid aus ADONIS VERNALIS

Die vereinigten Säulenfraktionen 6 - 23 aus SC 6 bei 2 % Methanolzusatz in der mobilen Phase enthielten neben Ballaststoffen und geringen Mengen Strophanthidin die Hauptmenge an Glykosid "grün I". Durch zweimalige präparative Schichtchromatographie auf selbsthergestellten Platten von 0,5 mm und Fertigplatten von 0,25 mm Schichtdicke im System II erhielten wir etwa 12 mg amorphes Glykosid "grün I", das sich in den Systemen I - V als einheitlich erwies, jedoch im System VI zwei Flecken ergab. Erneute präparative Schichtchromatographie im System VI lieferte 5 mg Glykosid "grün I" und 4 mg Glykosid "grün III". Beide Glykoside erstarrten beim Einengen der Eluate zu glasklaren spröden Massen, kristallisierten jedoch nicht.

Glykosid "grün I" wurde durch papier- und dünnschichtchromatographische Vergleiche der nach saurer Hydrolyse erhaltenen Spaltprodukte mit authentischem Material als Strophanthidin-D-digitalosid identifiziert.

UV-Spektrum:	λmax = 217 nm		
	ε = 11570	log ε	= 4,06
IR-Spektrum:	OH-Valenz	3450	cm^{-1}
	C-H-Valenz	2960	cm^{-1}
	Butenolid-	1745	cm^{-1}
	ring	1638	cm^{-1}

Schmelzpunkt:	138 - 143 °C
MS (FD)-Spektrum:	565 (M+1) Molekülpeak
	405 (M+1) Aglykon
	358 (M+1) Aglykon - H_2O - -CHO

Nach saurer Hydrolyse des durch Reduktion mit $NaBH_4$ erhaltenen Produktes wurde Strophanthidol durch Cochromatographie mit authentischem Material im System I nachgewiesen.

III.2. Isolierung und Identifizierung von Strophanthidin-digitalosid aus STROPHANTHUS HISPIDUS

Der braungefärbte, zähe Rückstand der durch präparative Papierchromatographie gewonnenen Glykosidfraktion enthielt neben wenig Helveticosid die Hauptmenge an Glykosid "x". Präparative Schichtchromatographie an selbsthergestellten Kieselgelschichten von 0,5 mm erbrachte 3 mg schwach gelbes, einheitliches Glykosid "x", dessen Laufstrecken mit denen von Strophanthidin-D-digitalosid aus ADONIS VERNALIS in den Systemen I - VI übereinstimmten. Nach saurer Hydrolyse ergaben die Spaltstücke papier- und dünnschichtchromatographisch gleiche Laufstrecken wie authentisches Strophanthidin und authentische Digitalose.

UV-Spektrum:	λ max = 217 nm	
	ε = 11560	$\log \varepsilon$ = 4,06
IR-Spektrum:	OH-Valenz	3450 cm^{-1}
	C-H-Valenz	2950 cm^{-1}

Butenolidring 1745 cm^{-1}

1635 cm^{-1}

Schmelzpunkt: 145 - 150 °C

Strophanthidol wurde als Aglykon des Reduktionsproduktes mit $NaBH_4$ nach saurer Hydrolyse nachgewiesen.

III.3. Identifizierung der Glykoside D und E aus STROPHANTHUS LEDIENII als Helveticosid bzw. Helveticosol

Die Glykoside D und E waren Hauptbestandteile einer von LICHTI, TAMM und REICHSTEIN [26] aus STROPHANTHUS LEDIENII isolierten Glykosidfraktion, in der vier weitere Cardenolide in Spuren vorhanden waren, darunter auch Emicymarin. Von diesem Gemisch standen uns etwa 1,5 mg zur Verfügung.

Nach saurer Hydrolyse von 1 mg des Gemisches ließen sich die Aglyka Strophanthidin, Strophanthidol und in geringen Mengen Periplogenin dünnschichtchromatographisch nachweisen. Aus der wäßrigen Phase konnten nur Digitoxose und in Spuren Digitalose durch Cochromatographie mit authentischem Material identifiziert werden.

Die Laufstrecken der Glykoside D und E waren in den Systemen II und III mit denen von Helveticosid und Helveticosol identisch. Beide Glykoside ergaben positive Xanthydrolreaktion.

III.4. Isolierung und Charakterisierung von Glykosid "grün III" aus ADONIS VERNALIS

Glykosid "grün III" wurde, wie unter III.1. beschrieben, durch präparative Schichtchromatographie im System VI von Strophanthidin-D-digitalosid abgetrennt. Das Aglykon dieses Glykosides war ebenfalls mit Strophanthidin identisch, der Zucker zeigte papier- und dünnschichtchromatographisch gleiche Laufstrecke wie authentische D-Digitalose. Das IR-Spektrum von Glykosid "grün III" unterscheidet sich im Fingerprintbereich nur durch die Intensität einzelner Banden von dem des Strophanthidin-D-digitalosides. Es ist nahezu identisch mit dem IR-Spektrum von Strophanthidin-D-digitalosid aus STROPHANTHUS HISPIDUS.

UV-Spektrum: $\lambda max = 217$ nm

$\varepsilon = 11280$ $\log \varepsilon = 4{,}05$

Schmelzpunkt: 147 - 152 °C

III.5. Isolierung und Identifizierung von Desglucocheirotoxin aus ADONIS VERNALIS

Die Fraktionen 12 - 52 von SC 5 bei 30 % Methanolzusatz in der mobilen Phase enthielten neben größeren Mengen an Ballaststoffen Spuren eines Cardenolides, das sich mit Vanillin-Schwefelsäure rot färbte, sowie die Hauptmenge an Glykosid "grün II". Durch präparative Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel-GF-Platten von 0,5 mm Schichtdicke

im System II und erneute Chromatographie auf Kieselgel-GF-Fertigplatten im System III erhielten wir 9,5 mg gelb gefärbten Rückstand, der in wenig Methanol-Wasser gelöst wurde. Aus dieser Lösung schieden sich in der Kälte im Laufe einer Woche kleine farblose Nadelbüschel aus, die nach Abheben der Mutterlauge mehrmals mit Eiswasser gewaschen wurden. Nach dem Trocknen im Vakuum resultierten 4 mg kristallines Glykosid "grün II", das chromatographisch mit Desglucocheirotoxin identisch war. Aglykon und Zuckerkomponente lieferten nach saurer Hydrolyse des Glykosides in allen verwendeten Systemen gleiche Laufstrecken wie Strophanthidin und D-Gulomethylose aus authentischem Desglucocheirotoxin.

Zur Aufnahme der IR-Spektren wurden aus Mangel an größeren Mengen authentischen Materials Preßlinge mit Bleireduzierringen hergestellt (ca. 0,2 mg je Preßling). Die Spektren beider Glykoside ergaben eine Übereinstimmung in allen Banden.

UV-Spektrum: λmax = 216 nm

ε = 15420 $\log \varepsilon$ = 4,19

Schmelzpunkt: Glykosid "grün II" 192 - 197 °C

Desglucocheirotoxin 192 - 196 °C

Der Mischschmelzpunkt ergab keine Depression.

III.6. Isolierung und Charakterisierung von Glykosid "blau" aus ADONIS VERNALIS

Glykosid "blau" war neben wenig Strophanthidin in den Fraktionen 27 - 35 von SC 6 bei 1 % Methanol in der mobilen Phase enthalten. Die Trennung von Ballaststoffen und Strophanthidin erfolgte auf selbstbeschichteten Kieselgel-GF-Platten von 0,5 mm Schichtdicke. Glykosidzonen in Dünnschichtchromatogrammen färbten sich mit Vanillin-Schwefelsäure graublau mit violettem Hof.

Beim Einengen des in wenig Methanol-Wasser gelösten Rückstandes von Glykosid "blau" erhielten wir durch spontane Kristallisation 5 mg farblose Nadelbüschel. Nach saurer Hydrolyse des Glykosides war aus dem Rückstand der organischen Phase ein Produkt nachweisbar, das in den Systemen I und III deutlich höhere Laufstrecken aufwies als Glykosid "blau". Aus der wäßrigen Phase konnte jedoch kein Zucker nachgewiesen werden.

Das erhaltene Produkt ergab positive KEDDE-Reaktion [22] und gleiche Färbung mit Vanillin-Schwefelsäure wie die Ausgangssubstanz.

UV-Spektrum:	λmax_1 =	217 nm
	λmax_2 =	262 nm
IR-Spektrum:	OH-Valenz	3425 cm^{-1}
	C-H-Valenz	2960 cm^{-1}
	Butenolid-	1755 cm^{-1}
	ring	1620 cm^{-1}

	zusätzliche Carbonylgruppe 1725 cm^{-1}
Schmelzpunkt:	211 - 214 °C
MS (FD)-Spektrum:	Massenzahlen 387 bzw. 390

III.7. Isolierung und Identifizierung von Cymarol aus ADONIS VERNALIS

In den Fraktionen 9 - 26 von SC 6 mit Chloroform als mobiler Phase waren die Glykoside "grau I" und "grau II" enthalten. Die Trennung erfolgte im System I an selbstergestellten Kieselgel-GF-Schichten von 0,5 mm Schichtdicke.

Glykosid "grau I" ergab aus Methanol-Wasser 5 mg grobe, farblose Kristalle und wurde durch Cochromatographie mit authentischem Material als Cymarol identifiziert. Aglykon und Zucker lieferten gleiche Laufstrecken wie Strophanthidol und Cymarose, Glykosid und Zuckerkomponente zeigten positive Xanthydrolreaktion.

UV-Spektrum:	λmax = 217 nm
	ε = 13250 log ε = 4,12
IR-Spektrum:	völlig identisch mit authentischem Cymarol
Schmelzpunkt:	unscharf 215 - 240 °C
MS (FD)-Spektrum:	551 (M+1) Molekülpeak

III.8. Isolierung und Charakterisierung von Glykosid "grau II" aus ADONIS VERNALIS

Glykosid "grau II" wurde wie unter III.7. von Glykosid "grau I" abgetrennt. Nach der Elution resultierten 3 mg des amorphen Glykosides, das positive Xanthydrolreaktion ergab.

Aglykon und Zuckerkomponente waren chromatographisch mit Strophanthidol und Cymarose identisch, das Massenspektrum erbrachte die gleiche Massenzahl wie für Cymarol. Der leicht deformierte Peak des UV-Spektrums sowie die Extinktion ließen auf Verunreinigungen mit Kieselgel schließen. Beim Versuch einer weiteren Reinigung wurde das Glykosid teilweise gespalten.

UV-Spektrum: λmax = 216 nm

MS (FD)-Spektrum: 551 (M+1) Molekülpeak

407 (M+1) Aglykon

IV. Quantitative Dünnschichtchromatographie

IV.1. Substanzen, Konzentrationen, Lösungen und Auftragesystem

a) ADONIS VERNALIS

Glykosidstammlösung aus 5,00 ml Konzentrat (nach I.1., Seite 121); 0,5 µl Stammlösung entsprechen 0,83 µl Konzentrat; Eichlösungen aus Adonitoxin in Chloroform-Methanol (1+1)

E_1 : 0,5 µl entsprechen 0,1 µg Adonitoxin

E_2 : 0,5 µl " 0,3 µg "

E_3 : 0,5 µl " 0,5 µg "

b) NERIUM OLEANDER

Glykosidstammlösung aus 5,00 g Droge (nach I.2., Seite 123)

0,5 µl Stammlösung entsprechen 360 µg Droge

Eichlösungen aus Oleandrin in Chloroform-Methanol (1+1)

E_1 : 0,5 µl entsprechen 0,1 µg Oleandrin

E_2 : 0,5 µl " 0,3 µg "

E_3 : 0,5 µl " 0,5 µg "

c) URGINEA MARITIMA

Glykosidstammlösung aus 5,00 g Droge (nach I.2., Seite 123)

1 µl Stammlösung entspricht 350 bzw. 700 µg Droge

Eichlösungen aus Scillaren A und Proscillaridin A in Chloroform-Methanol (1+1)

E_1 : 1 µl entspricht 0,2 µg Scillaren A / Proscill. A

E_2 : 1 µl " 0,6 µg " / "

E_3 : 1 µl " 1,0 µg " / "

Stammlösung zur spektralphotometrischen Proscillaridin-A-Bestimmung aus 5,00 g Droge, 1 ml Stammlösung entspricht 1,40 g Droge.

Eichlösung: 5 mg Proscillaridin A in Chloroform-Methanol (1+1) zu 5,00 ml gelöst

d) MIROTON ®

Stammlösung aus 5,00 ml Konzentrat (nach I.3., Seite 125)

0,5 µl Stammlösung entsprechen 0,85 µl Konzentrat

Eichlösungen aus Adonitoxin und Oleandrin wie bei 1.a) und 1.b)

Auftragesystem:

0,5 µl und 1 µl MICROCAPS der Firma DRUMMOND SCIENTIFIC COMPANY, U.S.A., SHANDON Labortechnik, Frankfurt/Main

IV.2. Chromatographische Parameter

DC-Platten

Kieselgel 60 Fertigplatten der Firma MERCK, Darmstadt, Artikel 5721, bei Verwendung von Platten mit Fluoreszenzindikator Artikel 5715.

Die Startlinie liegt bei allen Chromatogrammen 2 cm vom unteren Rand entfernt, der Abstand der Einzelauftragungen untereinander beträgt 2,3 cm [39] nach folgendem Auftrageschema:

$$E_1\ E_1\ E_2\ A\ A\ E_2\ E_3\ E_3$$

Hierin steht E für Eichlösung, A für Analysenlösung.

Fließmittelsysteme

Die Komponenten der Fließmittelsysteme besitzen p.a. Qualität, die Entwicklung erfolgt in N-Kammern bei 20 °C, aufsteigend, jeweils nur eine Platte.

a) ADONIS VERNALIS

Chloroform-Methyläthylketon-Diäthylamin-Wasser (10+65+20+5), Laufstrecke 15 cm, ohne Kammersättigung

b) NERIUM OLEANDER

Benzol-Äthylacetat-Diäthylamin (70+20+10),
Laufstrecke 15 cm, ohne Kammersättigung

c) URGINEA MARITIMA

Chloroform-Methanol-Wasser (80+19+1) System II,
Laufstrecke 15 cm, Kammersättigung durch U-förmige
Auskleidung mit Filtrierpapier
bei zweitem Lauf: Chloroform-Äthylacetat (10+90),
Laufstrecke 15 cm, ohne Kammersättigung
Zur spektralphotometrischen Bestimmung von Proscillaridin A:
selbstbeschichtete Kieselgel-GF-Platten 0,25 mm
Chloroform-Methanol-Wasser (80+19+1) System II,
Laufstrecke 15 cm, Kammersättigung

d) MIROTON ®

Die bei 2.a) und 2.b) verwendeten Systeme unter den
gleichen Bedingungen

IV.3. Densitometerdaten

SCHOEFFEL SD 3000 Densitometer mit PHILIPS PM 8000 Schreiber
Monochromatoreintrittsspalt: 2 mm, Spalt: 10 mm x 0,5 mm
Lichtquelle: Hg/Xe, Tischvorschub: 50 mm/min

Substanz	Meßwellenlänge (nm)
Adonitoxin +)	Exzitation 365
	Emission 450
Oleandrin +)	Exzitation 365
	Emission 450
Scillaren A	Remission 260
Proscillaridin A	Remission 260

IV.4. Auswertung

Die Auswertung der aufgenommenen Fluoreszenzortskurven von Adonitoxin und Oleandrin beziehungsweise der Remissionsortskurven von Scillaren A und Proscillaridin A erfolgte über die jeweiligen Peakhöhen.

IV.5. Indirekte spektralphotometrische Bestimmung von Proscillaridin A

Auf selbstbeschichteten Kieselgel-GF_{254}-Platten wurden 10 µl, 20 µl und 30 µl der Stammlösung sowie 10 µl und 20 µl der Proscillaridin-A-Eichlösung als 1 cm breite Bänder aufgetragen. Eine weitere Bahn blieb für den Leerwert frei.

+) Zur Fluoreszenzanregung wurden die Kieselgel-GF-Platten in N-Kammern mit HCl bis zur Sättigung bedampft, die Platten waren dann im UV-Licht bei 254 nm gleichmäßig dunkelblau.

Nach dem Entwickeln der Platten unter den bei 2.c) genannten Bedingungen wurden die Proscillaridin-A-Zonen im UV-Licht bei 254 nm markiert, die Zonen ausgekratzt und in Schliffreagenzgläser überführt. Als Leerwert diente eine in Höhe des Proscillaridin-A-Fleckes entnommene Kieselgel-Leerzone.

In jedes der sechs Schliffreagenzgläser gaben wir darauf 3,00 ml Methanol und anschließend 1,00 ml 1 N KOH. Nach 30 Minuten wurde durch Blaubandfilter filtriert und die Extinktion der Filtrate bei 352 nm gegen den Leerwert gemessen (PM Q II der Firma LEITZ).

Die Berechnung des Gehaltes an Proscillaridin A nahmen wir anhand folgender Formel vor:

$$\mu g \text{ Proscillaridin A} = \frac{E_A \times \mu g_B}{E_B}$$

Dabei ist: E_A = Extinktion der Analysenlösung

E_B = Extinktion der Eichlösung

μg_B = Menge der Bezugssubstanz Proscillaridin A

G. Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlußbetrachtung

Neben den bisher in ADONIS VERNALIS aufgefundenen herzwirksamen Inhaltsstoffen konnten im Kraut dieser RANUNCULACEE sechs weitere Cardenolide nachgewiesen und durch Säulenchromatographie an Aluminiumoxid sowie präparative Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelschichten in reiner Form erhalten werden. Zur Charakterisierung wurden papier- und dünnschichtchromatographische Vergleiche mit authentischem Material, Farbreaktionen mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz, IR-, UV- und FD-Massen-Spektren sowie Schmelzpunktsbestimmungen herangezogen.

Im einzelnen handelt es sich um die Strophanthidinglykoside Desglucocheirotoxin (Strophanthidingulomethylosid), Strophanthidindigitalosid und Glykosid "grün III", dessen Zuckerkomponente ebenfalls als Digitalose identifiziert wurde, das jedoch abweichendes chromatographisches Verhalten aufweist. Als Ursache werden unterschiedliche Verknüpfung von Aglykon und Zuckeranteil in den beiden letztgenannten Glykosiden sowie das Vorliegen des Zuckers in der pyranoiden bzw. furanoiden Form diskutiert.

Weiterhin wurden mit Cymarol (Strophanthidolcymarosid) und Glykosid "grau II" zwei Strophanthidolabkömmlinge identifiziert. Bei Glykosid "grau II" handelt es sich unseren Untersuchungen zufolge ebenfalls um Strophanthidolcymarosid; es ist jedoch aufgrund chromatographischer Vergleiche nicht mit Cymarol identisch. Auch hier werden unterschiedliche Verknüpfung zwischen Aglykon und Zuckerkomponente einerseits

sowie das Vorliegen des Zuckers in der pyranoiden bzw. furanoiden Form andererseits als mögliche Ursachen diskutiert.

Schließlich wurde mit Substanz "blau" ein Cardenolid aufgefunden, das zunächst aufgrund seines chromatographischen Verhaltens als Monoglykosid angesprochen werden konnte. Nach saurer Hydrolyse konnte jedoch der Nachweis einer Zuckerkomponente nicht erbracht werden. Da überdies dem FD-Massenspektrum kein Hinweis für das Vorliegen eines Glykosides zu entnehmen war, die größte faßbare Massenzahl ergab sich mit M = 390, sollte es sich bei Substanz "blau" um ein Aglykon handeln. Die im IR-Spektrum bei 1725 cm^{-1} zusätzlich zu den dem Butenolidring zuzuschreibenden Banden auftretende ausgeprägte Bande wird in Anlehnung an die Strukturermittlung des Sarverogenins [33] einer zusätzlichen Keto-Gruppe am Steroidgrundkörper zugeordnet. Die von uns isolierte Substanz ist mit keinem der aufgrund des chromatographischen Verhaltens und ähnlicher Färbung mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz zu Vergleichszwecken herangezogenen Aglyka identisch, so daß Substanz "blau" als neues Cardenolid angesprochen werden kann. Weitere Untersuchungen zur Strukturaufklärung von Substanz "blau" waren infolge der geringen zur Verfügung stehenden Mengen zunächst nicht möglich.

Darüberhinaus wurde aus den Samen von STROPHANTHUS HISPIDUS ein Cardenolid isoliert und mit Strophanthidindigitalosid identifiziert. Dieses Glykosid ist mit dem von uns aus ADONIS VERNALIS isolierten Strophanthidindigitalosid identisch.

Der Vergleich der als Strophanthidindigitalosid identifizierten Glykoside aus ADONIS VERNALIS und STROPHANTHUS

HISPIDUS mit von LICHTI, TAMM und REICHSTEIN [26] aus STROPHANTHUS LEDIENII isoliertem Strophanthidindigitalosid ergab keine Übereinstimmung. Bei weiteren von uns angestellten Untersuchungen erwiesen sich die als Substanz D (Strophanthidindigitalosid) und E bezeichneten Glykoside aus STROPHANTHUS LEDIENII als mit Helveticosid bzw. Helveticosol identisch.

Im Hinblick auf eine Qualitätskontrolle herzglykosidhaltiger Drogen und daraus hergestellter Extrakte wurden Methoden zur quantitativen Bestimmung der Glykoside Adonitoxin aus ADONIS VERNALIS, Oleandrin aus NERIUM OLEANDER und Scillaren A sowie Proscillaridin A aus URGINEA MARITIMA durch dünnschichtchromatographische Direktauswertung erarbeitet. Angeregt wurden diese Untersuchungen durch die Tatsache, daß über längere Zeiträume gelagerte Extrakte herzglykosidhaltiger Drogen ein deutliches Absinken des Glykosidgehaltes erkennen lassen und daher eine Standardisierung geboten erscheint.

Weiterhin sollte der Versuch unternommen werden, einen Beitrag zur Klärung der teilweise divergierenden Literaturangaben bezüglich des Anteiles der Glykoside Adonitoxin und Oleandrin am jeweiligen Gesamtglykosidgehalt sowie des Verhältnisses der Glykoside Scillaren A und Proscillaridin A zueinander zu liefern.

Die Gehaltsbestimmung von Adonitoxin aus ADONIS VERNALIS und Oleandrin aus NERIUM OLEANDER erfolgte nach dünnschichtchromatographischer Trennung unter für den jeweiligen Polaritätsbereich optimierten Bedingungen und nach Fluoreszenzanregung durch HCl-Dampf anhand densitometrischer in situ-Fluoreszenzmessung. Dabei wurde von uns der Anteil des Adonitoxins

am Gesamtglykosidgehalt eines frischen ADONIS-Konzentrates mit 7,2 % und der Anteil von Oleandrin am Gesamtglykosidgehalt eines aus handelsüblicher Droge hergestellten Extraktes mit 6,6 % ermittelt. Die Angaben in der Literatur belaufen sich für Adonitoxin auf bis zu 30 % [19], während Oleandrin einerseits als fast ausschließlich in der glucosereicheren Form der Glucooleandrine vorkommend [16], andererseits als Hauptglykosid neben Adynerin beschrieben wird [34].

Das Mengenverhältnis von Scillaren A zu Proscillaridin A ergab sich durch in situ-Remissionsmessung der Glykoside nach der Auftrennung des Gesamtextraktes einer aus dem Drogenhandel bezogenen Droge in einem geeigneten System mit etwa 1:1,5, während in der Literatur das Verhältnis der beiden Glykoside aus einem wäßrig-äthanolischen Extrakt mit 6:1 angegeben wird [16].

Darüberhinaus wurden die von uns erarbeiteten Methoden zur quantitativen Bestimmung der Glykoside Adonitoxin, Oleandrin, Scillaren A und Proscillaridin A auf ihre Eignung zur Qualitätskontrolle des Kombinationspräparates MIROTON® überprüft. Mit Adonitoxin und Oleandrin waren nur zwei der überprüften vier Glykoside der quantitativen Bestimmung zugänglich, da die in situ-Remissionsmessung von Scillaren A und Proscillaridin A aufgrund der Überlagerung durch Ballaststoffe nicht möglich war. Dennoch erscheint uns die Gehaltsbestimmung von Adonitoxin und Oleandrin aus dem Kombinationspräparat insofern gerechtfertigt, als beide Glykoside sehr empfindlich auf eine unsachgemäße Lagerung von entsprechenden Extrakten und Präparaten ansprechen. Daher kann ein absinkender Gehalt

dieser beiden Cardenolide als Hinweis zur Beurteilung der Qualität des jeweiligen Präparates herangezogen werden.

Anhand der von uns aus ADONIS VERNALIS isolierten und charakterisierten Strophanthidin- und Strophanthidolglykoside lassen sich über die bisher bekannten hinaus zusätzliche Verknüpfungspunkte im Glykosidmuster dieser RANUNCULACEE mit cardenolidhaltigen Pflanzen anderer Familien aufzeigen. Mit Strophanthidindigitalosid, das nach Identifizierung des Glykosides D aus STROPHANTHUS LEDIENII [26] mit Helveticosid unseres Wissens erstmalig als natürlich vorkommend in ADONIS VERNALIS und STROPHANTHUS HISPIDUS nachgewiesen wurde, findet sich ein weiterer Hinweis auf das gleichzeitige Vorkommen von Strophanthidinabkömmlingen in ADONIS VERNALIS und verschiedenen STROPHANTHUS-Arten.

Weiterhin konnten, unseren Vermutungen entsprechend, mit dem Auffinden von Cymarol und Glykosid "grau II" erstmals Strophanthidolglykoside in ADONIS VERNALIS nachgewiesen werden, so daß auch hier wie in vielen STROPHANTHUS-Arten und in CONVALLARIA MAJALIS Strophanthidin- und Strophanthidolabkömmlinge nebeneinander vorliegen.

Darüberhinaus ergibt sich ein weiterer Verknüpfungspunkt durch die Isolierung des bisher in ADONIS VERNALIS nicht bekannten Desglucocheirotoxins, das zuvor bereits aus CONVALLARIA MAJALIS, CHEIRANTHUS CHEIRI und ANTIARIS TOXICARIA nachgewiesen worden ist.

Das Ergebnis der Untersuchungen darf als erneuter Hinweis für die Überlagerung der Glykosidspektren unterschiedlicher herzwirksame Glykoside führender Pflanzen angesehen werden.

H. Literaturverzeichnis und Abbildungsnachweis

1) Ortus sanitatis uff teutsch ein gart der gesuntheit (1485)
Nachdruck 1966 durch Verlag Konrad Kölbl, München-Allach

2) BRUNFELS, Otho

Contrafayt Kreüterbuch Nach rechter vollkommener art/ unud [!]Beschreibungen der Alten/ besstberuempten aertzt/ vormals in Teütscher sprach/ der maßen nye gesehen/ noch im Truck außgegangen...

Hans Schott, Straßburg 1532

Nachdruck 1964 durch Verlag Konrad Kölbl, München

3) FUCHS, Leonhart

New Kreüterbuch/ in welchem nit allein die gantz histori/ das ist/ namen/ gestalt/ statt und zeit der wachsung/ natur/ krafft und würckung/ des meysten theyls der Kreüter so in Teütschen unnd andern Landen wachsen/ mit dem besten vleiß beschriben/ sonder auch aller derselben wurtzel/ stengel/ bletter/ blumen/ samen/ frücht/ und in summa die gantze gestalt/ allso artlich und kunstlich abgebildet und contrafayt ist/ das deßgleichen vormals nie gesehen/ noch an tag komen.

Michael Isingrin, Basel 1543

Nachdruck 1964 durch Verlag Konrad Kölbl, München

4) BOCK, Hieronymus

Kreütterbuch, Darin underscheidt, Nammen und Würckung der Kreütter, Stauden/ Hecken und Beumen/ sampt ihren Fruechten/ so inn Teutschen Landen wachsen/ auch derselben eigentlicher unnd wolgegruendter Gebrauch... Item von den vier Elementen/ zamen und wilden Thieren/ auch Vöglen und Fischen/ Milch/ Kaeß/ Butter/ Honig/ Wachß/... Jetzund auffs new mit allem fleiß ubersehen/

und mit vilen nuetzlichen Experimenten gebessert un̄ gemehret... Durch den Hochgelehrten MELCHIOREM SEBIZIUM Silesium, der Artzney Doctorn zu Straßburg.

Josias Rihel, Straßburg 1577

Nachdruck 1964 durch Verlag Konrad Kölbl, München

5) LONICERUS, Adamus:

Kreuterbuch/ Kunstliche Conterfeytunge der Baeume/ Stauden/ Hecken/ Kraeuter/ Getreyd/ Gewuertze/... Sampt vorher gesetztem und gantz außfuerlich beschriebenem Bericht der schoenen und nuetzlichen Kunst zu Destillieren/ wie auch Bauung der Gaerten und Pflantzung der Baeume. Item von den fuehrnembsten Gethieren der Erden/ Voegeln/ Fischen und Gewuerm. Deßgleichen von Metallen/ Ertze/ Edelgesteinen/ Gummi und gestandenen Saefften.

Matthäus Wagner, Ulm 1679

Nachdruck 1964 durch Verlag Konrad Kölbl, München

6) BESLER, Basilius:

HORTUS EYSTETTENSIS (1713)

Nachdruck 1964 durch Verlag Konrad Kölbl, Grünwald b. München

7) TABERNAEMONTANUS, D. Jacobus Theodorus:

Neu vollkommen Kraeuter=Buch/ Darinnen Uber 3000. Kraeuter/ mit schoenen und kunstlichen Figuren/ auch deren Underscheid und Wuerckung/ sam̄t ihren Namen in mancherley Sprachen/ beschrieben... Und nun zum vierdten mahl aufs fleissigst uebersehen/ an unzahlbaren Orten absonderlich verbessert/ an scheinbaren Maengeln durchaus ergaentzt/ und endlichen zu hochverlangter Vollkommenheit gebracht.
Johann Ludwig König, Basel 1731

Nachdruck 1964 durch Verlag Konrad Kölbl, München

8) REICHSTEIN, T. und H. ROSENMUND:

Isolierung eines kristallisierten, stark herzwirksamen Glykosids aus Adonis vernalis und seine Identifizierung als Cymarin.

Pharm. Acta Helv. 15, 150 (1940)

9) KARRER, W.:

Über Hellebrin, ein kristallisiertes Glykosid aus Radix Hellebori nigri.

Helv. Chim. Acta 26, 1353 (1943)

10) KATZ, A. und T. REICHSTEIN:

Adonitoxin, das zweite stark herzwirksame Glykosid aus Adonis vernalis.

Pharm. Acta Helv. 22, 437 (1947)

11) TSCHESCHE, R. und R. PETERSEN:

Über pflanzliche Herzgifte. XXIII. Mitteil.: Die Konstitution des Adonitoxigenins.

Chem. Ber. 86, 574 (1953)

12) CEKAN, Z. und J. PITRA:

16-OH-Strophanthidin and Acetyladonitoxin, two new cardenolides from Adonis vernalis L.

Chem. and Ind. 41, 497 (1960)

13) KOLESNIKOV, D.G. und N.A. BUGRIM:

Cardiac glycosides of Adonis vernalis.
Med. Prom. S.S.S.R. 14, Nr. 2, 19-21 (1960)
ref. in C. A. 54, 21647 f (1960)

Cardiac glycosides from Adonis vernalis. II.
Med. Prom. S.S.S.R. 14, Nr. 7, 27-30 (1960)
ref. in C. A. 55, 10801 h (1961)

14) POLAKOVA, A. und Z. CEKAN:

Vernadigin and 3-Acetylstrophadogenin, Two New Cardenolides from Adonis vernalis L.

Chem. and Ind. 44, 1766 (1963)

15) CSEREP, A., L. MASLER, D. SIKL und S. BAUER:

Adonitoxol, a new cardiac glycoside of Adonis vernalis
Chem. Zvesti 18, 273 (1964)
ref. in C. A. 61, 9572 a (1964)

16) GÖRLICH, B.:

Chemische Wertbestimmung der Glykoside eines pflanzlichen Herz- und Kreislaufmittels.

Arzneim.-Forsch. 15, 493 (1965)

17) BUCHNER, S., H. JACKOWSKA, K. KIKUCHI, K.K. CHEN:

A new glycoside of Adonis vernalis.
Life Sci. 4, 37 (1965)

18) WICHTL, M., K. JENTZSCH und E. TÜRK:

Strophanthidin-fucosid, ein neues Cardenolidglykosid aus Adonis vernalis L.

Monatsh. Chem. 103, 889 (1972)

19) BOGS, U. und L. HARNISCH:

Über Adonis vernalis und seine galenischen Zubereitungen
Pharmaz. Zentralhalle 105, 582 (1966)

20) BALJET, H.:

Glucosiden met Digitaliswerking. Eene nieuwe Identiteitsreactie.
Pharm. Weekbl. 55, 457 (1918)

21) TÜRK, E.:

Die herzwirksamen Inhaltsstoffe von Adonis vernalis L. und ihre quantitative Bestimmung.

Dissertation Wien 1971

22) KEDDE, D.L.:

Pharm. Weekbl. 82, 741 (1947)

23) PUSZ, A. und S. BÜCHNER:

Papierchromatographische Untersuchung der Blüten von Adonis vernalis L.
Arzneim.-Forsch. 12, 932 (1962)

The Chromatographic Examination of Adonis vernalis L.
Arzneim.-Forsch. 13, 409 (1963)

24) MANNICH, C. und G. SIEWERT:

Über g-Strophanthidin (Ouabain) und g-Strophanthidin
Ber. Dtsch. Chem. Ges. 75, 737 (1942)

25) STOLL, A., E. ANGLIKER, F. BARFUSS, W. KUSSMAUL und J. RENZ:

Trennung und Bestimmung herzwirksamer Glykoside und deren Aglykone durch Chromatographie an Silicagel.

Helv. Chim. Acta 34, 1460 (1951)

26) LICHTI, H., Ch. TAMM und T. REICHSTEIN:

Die Glykoside der Samen von Strophanthus Ledienii Stein.

Helv. Chim. Acta 39, 1914 (1956)

27) SCHEFFER, F. und R. KIKUTH:

Neue Systeme für die papierchromatographische Trennung von Kohlenhydraten

Z. Anal. Chem. 191, 116 (1962)

28) NAGATA, W., Ch. TAMM und T. REICHSTEIN:
Die Glykoside von Erysimum crepidifolium H.G.L. Reichenbach
Helv. Chim. Acta 40, 41 (1957)

29) KAISER, F., E. HAAK, M. GUBE, U. DÖLBERG und H. SPRINGLER:
Neue Glykoside aus den Samen von Strophanthus kombe.
Naturwissenschaften 46, 670 (1959)

30) ALLGEIER, H., Ek. WEISS und T. REICHSTEIN:
Die Struktur von Mansonin und Strophothevosid.
Helv. Chim. Acta 50, 456 (1967)

31) KILIANI, H.:
Über Digitalinum verum.
Ber. Dtsch. Chem. Ges. 63, 2866 (1930)

32) JENSEN, K.B.:
Acta pharmacol. toxicol. Köbnhavn 9, 99 (1953)

33) FUHRER, H., R.F. ZÜRCHER und T. REICHSTEIN:
Sarverogenin, vermutliche Struktur.
Helv. Chim. Acta 52, 616 (1969)

34) MARQUARDT, G.:
Zur chemischen Bestimmung der Steroidglykoside in einem alkoholischen Oleander-Trockenextrakt.
Arzneim.-Forsch. 19, 1146 (1969)

35) KRAUS, K., E. MUTSCHLER und H. ROCHELMEYER:
Zur Analytik und Wertbestimmung von Extrakten aus Bulbus Scillae
Arzneim.-Forsch. 19, 322 (1969)

36) KOVAR, K.-A., G. FRANCAS und R. SEIDEL:

Zum Mechanismus der Reaktionen nach Raymond, Kedde und Baljet.

Arch. Pharm. 310, 40 (1977)

37) PESEZ, M.M.:

Ann. pharm. franc. 10, 104 (1952)

38) WEHRLI, W., O. SCHINDLER und T. REICHSTEIN:

Die Glykoside des Milchsaftes von Antiaris toxicaria LESCH aus Malaya sowie von Antiaris africana ENGL. aus Kenya.

Helv. Chim. Acta 45, 1183 (1962)

39) HEROLD, G.:

Neue Auswertemethoden in der quantitativen Dünnschichtchromatographie

Dissertation Marburg 1975

40) KAUFMANN, H., P. MÜHLRADT und T. REICHSTEIN:

Differenzierung sämtlicher raumisomerer 6-Desoxyhexosen, 3-O-Methyl-6-desoxyhexosen und 6-Desoxyhexulosen.

Helv. Chim. Acta 50, 2287 (1967)

Abbildungsnachweis

Abb. 1 : Elleborus niger
Gart der gesuntheit (1485), Kapitel 166

Abb. 2 : schwartz Nießwurtz
BOCK, Hieronymus,
Kräuterbuch (1577), Seite 145

Abb. 3 : Veratrum nigrum
LONICERUS, Adamus,
Kräuterbuch (1679), Seite 383

Abb. 4 : Pseudo Helleborus niger
BESLER, Basilius,
Hortus Eystettensis (1713),
Fol. 4, Icones Plantarum Hyemalium III

Abb. 5 : Adonium
TABERNAEMONTANUS, D. Jakobus Theodorus,
Kräuterbuch (1731), Seite 72

Abb. 6 : Adonium luteum
ibidem, Seite 72

Abb. 7 : Adonis flore citrino
ibidem, Seite 1180

Abb. 8 : Helleborus Hippocratis
ibidem, Seite 1097

Lebenslauf

Am 9. Mai 1948 wurde ich als Sohn des Ingenieurs Wilhelm Junior und seiner Ehefrau Hermine, geb. Hanken, in Essen-Ruhr geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in Essen und Mülheim-Ruhr von 1954 bis 1958 wechselte ich auf die Alfred-Krupp-Oberschule, Gymnasium für Jungen, in Essen über und legte dort im Herbst 1966 die Reifeprüfung ab.

Die pharmazeutische Ausbildung begann ich als Praktikant in der Bären-Apotheke in Essen-West und bestand 1968 die Pharmazeutische Vorprüfung in Düsseldorf. Nach einjähriger Tätigkeit als Apothekeranwärter in meiner Lehrapotheke nahm ich im Wintersemester 1969 das Studium der Pharmazie an der Philipps-Universität in Marburg auf, das ich im April 1974 mit der Pharmazeutischen Staatsprüfung abschloß. Seit 1974 bin ich mit der Apothekerin Eveline Junior, geb. Böbs, verheiratet.

Im November des gleichen Jahres begann ich am Institut für Pharmazeutische Biologie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Wichtl die vorliegende Arbeit und bin seit 1975 als wissenschaftlicher Angestellter beschäftigt. Am 16. August 1977 wurde unsere Tochter Ulrike Sibylle geboren.